DE STOFWISSELING VAN HET BENZOËZUUR IN HET MENSCHELIJK ORGANISME

DOOR J. NEUBERG

DE STOFWISSELING VAN HET BENZOËZUUR IN HET MENSCHELIJK ORGANISME

Lane Medical Library

DE STOFWISSELING VAN HET BENZOËZUUR IN HET MENSCHELIJK ORGANISME

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS DR. P. ZEEMAN, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 16 MEI 1923, DES NAMIDDAGS TE 3 UUR, DOOR

J. NEUBERG

GEBOREN 16 MAART 1891, TE RINTELN

M. LINDENBAUM & Co. — DRUKKERS — AMSTERDAM

AAN MIJNE VROUW.

Aan het einde van mijne academische studie gekomen, is het mij een aangename taak, allen, die tot mijn vorming hebben bijgedragen, mijnen oprechten dank te betuigen.

In het bijzonder gaat mijn dank uit tot U, Hoogleeraren en Oud-Hoogleeraren in de medische- en natuur-philosophische faculteiten van Amsterdam.

Met innigen weemoed herdenk ik, heden in het bijzonder, den Hooggeleerden PEL en den Hooggeleerden WERTHEIM SALOMONSON. Hun beider nagedachtenis staat met onvergankelijken eerbied gegrift in hoofd en hart van allen, die het voorrecht hadden hunne lessen te volgen. Dat het mij gegeven is daaronder te behooren, reken ik mij tot eer.

Aan U, Hooggeleerden SNAPPER, hooggeachte promotor, ben ik zeer veel dank verschuldigd. Gij steldet mij in de gelegenheid geruimen tijd eerst amicitiae causa, later als assistent onder U werkzaam te zijn. Gij hebt het mij mogelijk gemaakt onder uwe leiding dit proefschrift op uw laboratorium te bewerken. Gij zijt als chef en als leermeester mijn leider en leidsman geweest. Moeilijk is het mij na te gaan in welke van deze beide qualiteiten gij meer voor mij geweest zijt en in welke gij in het latere stadium grooteren invloed op mijne academische vorming hebt uitgeoefend. Stellig weet ik, als mensch, dat er een derde functie was, waarin gij mij schraagdet en U daarvoor, voor die vriendschap dank te zeggen is mij een behoefte des harten. Ik kwijt mij bij deze van dezen aangenaamsten

der plichten en beveel mij ook verder in uwe gewaardeerde leiding aan.

De tijd, dien ik in uw laboratorium mocht doorbrengen, Hooggeleerde VAN RIJNBERK, was voor mij van groote waarde; het zij mij vergund U te zeggen, dat ik de daar genoten gastvrijheid niet licht vergeten zal.

Zeergeleerde GRUENBAUM ook tot U richt ik een woord van dank. Vroeg of laat, steeds waart gij bereid mij behulpzaam te zijn. Uw werklust en ijver zullen mij steeds tot voorbeeld strekken; uwe opvatting van collegiale samenwerking niet minder.

Ook tot U, Zeergeleerde DELPRAT, richt ik mijn woorden van dank, zoowel uit erkentelijkheid voor uwe vriendschap als voor uw mij zoo hartelijk verleenden bijstand bij het voor de pers gereedmaken van dit proefschrift.

Ten slotte nog een woord van dank, waarbij ik zeer zeker het technisch personeel van het Pathologisch Laboratorium niet kan vergeten, aan allen die mij behulpzaam zijn geweest bij het bewerken dezer dissertatie.

INHOUD.

Hoofdstuk I. Blz.

Inleiding 11

Hoofdstuk II.

Komt in de urine ongebonden benzoëzuur voor?.... 15

Hoofdstuk III.

Zou benzoëzuur gebonden aan andere stoffen behalve glycocoll kunnen uitgescheiden worden, gelijk door Magnus Levy is opgemerkt? 20

Hoofdstuk IV.

Methodiek der benzoëzuur- en hippuurzuur-bepalingen 27

Hoofdstuk V.

Proeven met de urine van den Voordag en den Proefdag. 50

Hoofdstuk VI.

De gemodificeerde methode van Kingsbury-Swanson 72

Hoofdstuk VII.

Het benzoëglucuronzuur wordt in de urine door minerale zuren niet neergeslagen. 92

Hoofdstuk VIII.

Identificeering van de totale hoeveelheid benzoëzuur. 100

Geraadpleegde literatuur 110

HOOFDSTUK I.

INLEIDING.

Bij de bestudeering van het hippuurzuur-vraagstuk wachten nog verschillende problemen op eene oplossing. Hieronder zullen wij een dezer vraagstukken bespreken en trachten op te lossen.

Het hippuurzuur, dat eene verbinding is van benzoëzuur en glycocoll, komt normaliter bij gemengd diëet in de menschelijke urine voor in een hoeveelheid, welke variëeren kan van 200—1200 m.gr. en meer. Bunge en Schmiedeberg[43] hebben aangetoond, dat bij den hond de synthese van hippuurzuur uitsluitend in de nier geschiedt. In 1915 hebben Kingsbury en Bell[31] het resultaat van deze beroemde proeven in twijfel getrokken: zij kwamen tot de conclusie, dat de synthese van het hippuurzuur ook in andere organen plaats grijpt.

Wij[54] hebben zoowel de proeven van Bunge en Schmiedeberg, als die van Kingsbury en Bell herhaald en op grond daarvan meenen wij ons te moeten scharen aan de zijde van Bunge en Schmiedeberg; wij vonden tevens, dat de synthese van hippuurzuur bij den *mensch* eveneens in de nier tot stand komt.

Waaruit ontstaat het hippuurzuur?

Het grootste deel van hippuurzuur, dat in de normale urine van menschen voorkomt, ontstaat uit het voedsel, hoofdzakelijk uit groenten en vruchten, welke veel benzoë-

zuur bevatten. Een klein deel van het hippuurzuur heeft zijn ontstaan te danken aan de rotting van eiwitten, waardoor volgens Salkowski[1] phenylpropionzuur en volgens Baumann[52] c.s. phenylalanin ontstaat, welke beide tot benzoëzuur geoxydeerd worden en gepaard aan glycocoll, als hippuurzuur in de urine verschijnen. De hoeveelheid hippuurzuur, die op deze wijze ontstaat, valt echter zelfs in de normale urine in het niet bij de hoeveelheid, die van het toegevoegde benzoëzuur afkomstig is.

Merkwaardigerwijze behoeft men geen glycocoll met het benzoëzuur toe te voeren: onverschillig hoeveel benzoëzuur men toevoert, steeds komt bijna al het benzoëzuur als hippuurzuur te voorschijn. Blijkbaar kan in de stofwisseling, indien noodig, een groote hoeveelheid glycocoll ontstaan. Men moet zich voorstellen, dat de toevoer van benzoëzuur een prikkel is, onder invloed waarvan een gedeelte van de bouwstoffen van het eiwit niet tot ureum worden afgebroken[44], maar in den vorm van glycocoll voor de binding aan benzoëzuur worden gereserveerd.

Het is de vraag of benzoëzuur alleen in den vorm van hippuurzuur het lichaam verlaat. Er bestaan n.l. nog vele andere mogelijkheden.

1e. Zou benzoëzuur als zoodanig in de urine kunnen worden afgescheiden.

2e. Zou benzoëzuur aan andere stoffen behalve glycocoll kunnen gebonden worden.

Zooals bekend is, hebben reeds vroegere onderzoekers, o.a. Salkowski[1], v. d. Velde en Stokvis[32], waargenomen, dat het benzoas natricus, hetwelk de patiënten gebruiken, slechts voor een deel als hippuurzuur wordt uitgescheiden. De laatste onderzoekers vonden tevens vrij benzoëzuur in

de urine; volgens hen wordt dit echter niet als zoodanig uitgescheiden, doch ontstaat het door splitsing van hippuurzuur. Het vrije benzoëzuur wordt n.l. speciaal waargenomen, wanneer de urine alkalisch is en in rotting verkeert. Ook bij patiënten met eiwithoudende urine konden zij een duidelijke splitsing van het hippuurzuur constateeren. Opdat men dus niet ten gevolge van splitsing van het hippuurzuur den indruk zou krijgen, dat vrij benzoëzuur wordt uitgescheiden, is het volgens deze schrijvers gewenscht de urine, indien het noodig mocht blijken, te onteiwitten en te zorgen, dat zij niet alkalisch is of bacteriën bevat. Dit laatste kan men voorkomen, door 1e. de urine zuur te maken en 2e. bactericide stoffen, zooals chloroform, toluol, formol etc. toe te voegen.

Schmiedeberg [20], Minkowski [27] en v. d. Velde en Stokvis [32] meenden, dat de splitsing van het hippuurzuur door fermenten werd veroorzaakt (het histozym), in tegenstelling hiermee heeft Seo [25] op een zeer eenvoudige manier bewezen, dat de oorzaak van de hippuurzuursplitsing in de urine niet van fermentatieven, maar van bacterieelen aard is. Wordt de urine 10 uur of meer aan de lucht blootgesteld, dan treedt splitsing van het hippuurzuur op; deze splitsing kan volgens Seo voorkomen worden, wanneer bactericide stoffen, zooals chloroform, toluol, thymol etc. aan de urine worden toegevoegd. Daar deze bactericide stoffen geen invloed op fermenten hebben, meent Seo, dat de hippuurzuursplitsing niet van fermentatieven, maar van bacterieelen aard is.

Ook wij vonden, dat het hippuurzuur in de urine niet gesplitst wordt, wanneer wij aan de urine chloroform-toluol in gelijke deelen of salpeterzuur (2 pCt.) toevoegen en

daarna de urine eenige dagen op een koele plaats bewaren.

Er rijst nu de volgende vraag:

Wanneer men een patiënt benzoas natricus laat gebruiken en voorzorgsmaatregelen neemt, dat de versch geloosde urine zuur reageert en geen eiwit of bacteriën bevat, vindt men dan in de urine alleen benzoëzuur gepaard aan glycocoll of komen voor deze paring nog andere stoffen in aanmerking? Salkowski [1] en Kobert [4] vermoedden, dat de toegediende benzoas natricus gedeeltelijk aan glycocoll, gedeeltelijk aan een andere stof gepaard in de urine verschijnt. Zij meenden, dat deze onbekende benzoëzuur-verbinding een glucosied was.

Magnus Levy [6] vond bij schapen, dat het toegediende benzoëzuur voor een deel aan glycocoll, voor een deel aan glucuronzuur gepaard, als benzoëglucuronzuur in de urine voorkomt.

In tegenstelling hiermee meenden Dakin [13] en Lewinski [11] (deze laatste liet zijn patiënten ieder uur 1—2 gr. benzoas natricus gebruiken tot 10—20 gr. in het geheel toegediend waren), dat de toegediende dosis benzoas natricus quantitatief als hippuurzuur in de urine terug te vinden is.

Hier staan twee meeningen tegenover elkaar, t.w. die van Magnus Levy en die van Dakin c.s. Wij hebben getracht een oplossing voor dit probleem te vinden en legden ons dus de vraag voor of benzoëzuur alleen in den vorm van hippuurzuur het lichaam verlaat of dat hiernaast:

1e. benzoëzuur als zoodanig in de urine zou voorkomen;

2e. benzoëzuur aan andere stoffen behalve glycocoll zou kunnen gebonden worden.

HOOFDSTUK II.

Komt in de urine ongebonden benzoëzuur voor?

Uit het voorafgaande weten wij reeds: wanneer hippuurzuur bevattende urine in rotting overgaat, kan hippuurzuur gesplitst worden en benzoëzuur in vrijen vorm ontstaan.

Men moet daarom, gelijk gezegd, voorzorgsmaatregelen nemen, opdat het hippuurzuur niet door rottingsbacteriën gesplitst kan worden. Wij vangen derhalve de versch geloosde urine van een normalen mensch met gemengd diëet in geconcentreerd salpeterzuur op (2 pCt. van het volume) en nemen hiervan 50 cc. Deze hoeveelheid wordt uitgeschud met 6 × 50 cc. petroleumaether (K.P. 28—40°) en daarna de petroleumaether verdampt.

Het is bekend, dat hippuurzuur niet, het benzoëzuur daarentegen wel in dit oplosmiddel overgaat; wanneer er dus na verdamping van den petroleumaether nog kristallen overblijven, kunnen deze niet van hippuurzuur, maar wel van benzoëzuur afkomstig zijn. Wij vinden echter in het geheel geen kristallen na verdampen van den petroleumaether, wel blijft er een bruinachtig residu over, dat wij in weinig water oplossen en titreeren met loog van ongeveer 0,2 N.; alsdan blijkt, dat er slechts een paar druppels noodig zijn. Men kan dus door uitschudden met petroleumaether geen kristallijne of zuur reageerende stof uit de zuurgemaakte urine extraheeren, m.a.w. *er komt, prac-*

tisch gesproken, geen ongebonden benzoëzuur in de normale urine voor.

Bovenstaande proef hebben wij acht maal herhaald en telkens weer gezien, dat in de versch geloosde urine van menschen met goed functionneerende nieren geen ongebonden benzoëzuur voorkomt.

Terwijl dit voor menschen met gemengd diëet geldt, blijft de vraag hetgeen geschiedt, wanneer wij nu een patiënt met normale nieren een groote dosis benzoas natricus (10—15 gr.) toedienen. Wordt dit dan in het menschelijke organisme in zijn geheel omgezet in hippuurzuur of zal een gedeelte aan de glycocoll-paring onttrokken worden en ongebonden in de urine voorkomen?

De uitscheiding van benzoëzuur als hippuurzuur gaat zeer snel. Reeds in de eerste 8 uur na toediening van het benzoëzuur wordt volgens Lewis [44] meer dan 90 % van de toegevoerde hoeveelheid als hippuurzuur uitgescheiden. Wij vonden in den regel in de eerste 8 uur 76—87,5 %, in de eerste 12 uur 85—94% van het benzoëzuur als hippuurzuur in de urine terug. Met het oog op de snelle uitscheiding van het toegediende benzoëzuur als hippuurzuur, hebben wij de urine meestal gedurende 3 × 8 uur (een enkele maal 2 × 12 uur of 4 × 6 uur) opgevangen en daar de grootste uitscheiding van het toegediende benzoëzuur als hippuurzuur in de eerste 8 uur valt, hebben wij de nu volgende proeven verricht met de urine, welke de eerste uren uitgescheiden is.

PROEF.

Wij laten een patiënt met normale nieren 3 poeders van 5 gr. benzoas natricus gebruiken en wel ieder uur een poe-

der. De urine wordt gedurende 2 × 12 uur opgevangen.

25 cc. urine van de eerste 12 uur worden aangezuurd met phosphorzuur, met 6 × 50 cc. petroleumaether (K.P. 28—40°) uitgeschud en de gezamenlijke porties petroleumaether verdampt. De methodiek van het verdampen van de petroleumaether, waarbij, om verlies van benzoëzuur te voorkomen, volstrekt geen verwarming mag plaats vinden, wordt later uitvoerig besproken bij de methode van Wiechowski.

Er moet zich bij het verdampen een ijskorst om de kolf vormen. Nadat de petroleumaether verdampt is zien wij, dat er geen kristallen ontstaan, terwijl wij bij het titreeren slechts een paar druppels loog van 0,2 N. noodig hebben.

Wanneer wij dezelfde proef met 25 cc. urine van de tweede 12 uur verrichten, vinden wij evenmin kristallen, terwijl wij bij titratie slechts een paar druppels loog van 0,2 N. noodig hebben.

Dergelijke proeven hebben wij acht malen verricht en steeds met hetzelfde resultaat.

Er blijkt dus hieruit, dat na toediening van 10—15 gr. benzoas natricus, practisch gesproken, geen ongebonden benzoëzuur in de urine van menschen met normale nieren voorkomt.

Welke resultaten krijgen wij nu bij menschen, die een zeer langzame hippuurzuur-uitscheiding hebben, d.w.z. bij patiënten met zieke nieren en vertraagde stikstof-uitscheiding [53]?

Bij deze patiënten ziet men n.l., dat de uitscheiding van het benzoëzuur als hippuurzuur niet in ongeveer 12 uur afloopt, doch langzaam in den loop van 2 of 3 × 24 uur

plaats vindt[53]. Komt bij deze langzame uitscheiding ook bijna alle benzoëzuur als hippuurzuur te voorschijn of zou bij dergelijke gevallen misschien vrij benzoëzuur in de urine voorkomen?

PROEF. 16. 2. 1922.

Een patiënt met schrompelnieren en ureumretentie (1,4 gr. per liter serum) laten wij 3 poeders van 5 gr. benzoas natricus gebruiken en vangen daarna de urine gedurende 3 × 12 uur op, met inachtneming van de bovengenoemde voorzorgsmaatregelen. Wij moeten dus bij dezen patiënt de urine onderzoeken:

1e. op hippuurzuur, om te zien of de uitscheiding van deze stof vertraagd is;

2e. op vrij benzoëzuur.

De hippuurzuur-bepalingen hebben wij verricht met de methode van Snapper-Laqueur, welke wij later op bladzijde 38 uitvoerig zullen bespreken.

Wanneer wij nu de hippuurzuur-bepalingen volgens deze methode verrichten, dan vinden wij voor den bovengenoemden patiënt met zieke nieren, die 3 × 5 gr. benzoas natricus gebruikt heeft, dat de hoeveelheid hippuurzuur, welke in de urine verschijnt:

De eerste 12 uur 1,209 gr. hippuurzuur bedraagt.

De tweede 12 uur 1,788 gr. hippuurzuur bedraagt.

De derde 12 uur 3,400 gr. hippuurzuur bedraagt.

De hippuurzuur-uitscheiding is dus aanzienlijk vertraagd; bij den normalen mensch zou bijna al het hippuurzuur reeds in de eerste 12 uur zijn uitgescheiden, desondanks vinden wij dezelfde resultaten voor het ongebonden benzoëzuur als bij de patiënten met normale nieren, die

15 gr. benzoas natricus gebruikt hebben; t.w. noch in de urine van de eerste 12 uur, evenmin als in die van de tweede of derde 12 uur komen kristallen van benzoëzuur voor, nadat wij de onteiwitte en aangezuurde urine hebben geschud met 6 × 50 cc. petroleumaether en deze daarna verdampen.

Bij titratie hebben wij voor ieder der drie urines slechts een paar druppels loog van 0,2 N. noodig.

Deze proef werd drie malen herhaald met hetzelfde resultaat.

Het blijkt dus, dat ook bij patiënten met schrompelnieren, na toediening van 15 gr. benzoas natricus, geen ongebonden benzoëzuur in de urine verschijnt, al is ook de hippuurzuur-uitscheiding aanzienlijk vertraagd.

Uit het voorafgaande is ons gebleken, dat geen ongebonden benzoëzuur in de urine van normale menschen met gemengd diëet aanwezig is; evenmin verschijnt benzoëzuur als zoodanig in de urine van normale menschen of patiënten met schrompelnieren, die een groote dosis (10—15 gr.) benzoas natricus gebruikt hebben.

HOOFDSTUK III.

Zou benzoëzuur gebonden aan andere stoffen behalve glycocoll kunnen uitgescheiden worden, gelijk door Magnus Levy [6] is opgemerkt?

Het is ons opgevallen, dat gedurende de eerste 8 uur na het gebruik van 10—15 gr. benzoas natricus, de urine groote qualitatieve veranderingen vertoont, t.w.

1e. De urine van de eerste 8 uur reduceert de oplossing van Fehling en die van Nylander.

2e. Wanneer wij aan 5 cc. urine van de eerste 8 uur 5 cc. HCl van 38 % en 1 cc. van een 1 % alcoholische naphtoresorcine-oplossing toevoegen, daarna gedurende 1 minuut koken, 3—4 minuten laten staan, vervolgens onder de waterkraan afkoelen en met een gelijke hoeveelheid aether schudden, dan wordt de aether donkerviolet gekleurd en het spectrum van de aetherische oplossing vertoont een zwarten band tusschen 500 en 600. Dit wijst reeds op de aanwezigheid van glucuronzuren.

Wanneer wij inplaats van met aether,

a. met benzol uitschudden, verkrijgen wij een roodviolette kleur en hetzelfde spectrum als hierboven,

b. met chloroform uitschudden, ziet men een blauwviolette kleur ontstaan en het spectrum vertoont ook hier weer denzelfden typischen band.

Volgens C. Neuberg en Saneyoshi[42] en Van der Haar[51] zijn deze beide laatste reacties typische glucuronzuur-reacties.

3e. De urine vertoont met orcine een positieve reactie.

Wanneer men aan 5 cc. urine ongeveer 100 m.gr. orcine en een gelijke hoeveelheid HCl van 38% toevoegt, gedurende 1 minuut kookt, afkoelt tot ongeveer 50° en met een gelijke hoeveelheid amylalcohol schudt, verkrijgt men een bruin-groene verkleuring, terwijl het spectrum een absorptiestreep in het rood bij 620 vertoont, die langzamerhand duidelijker wordt.

4e. De urine vertoont een positieve phloroglucine reactie.

Wanneer men aan 5 cc. urine van de eerste 8 uur ongeveer 50 m.gr. phloroglucine en 5 cc. HCl van 38 % toevoegt en het mengsel kookt, dan ontstaat een kersroode kleur, terwijl het spectrum een streep tusschen D en E vertoont.

Het hippuurzuur geeft deze reacties niet.

De bovengenoemde reacties, t.w. die van Fehling, Nylander, naphtoresorcine, orcine en phloroglucine zijn reacties, welke de glucuronzuren vertoonen; hierbij komt nog een andere eigenschap der glucuronzuren, n.l. de draaiïng van het polarisatie-vlak, waarover hieronder meer.

Om de eigenschappen van deze glucuronzuur-verbinding beter te leeren kennen, moet men haar zooveel mogelijk trachten te isoleeren. Daarom hebben wij nu naar een oplosmiddel van deze glucuronzuur-verbinding gezocht. Het is bekend, dat het aethylacetaat de vloeistof par excellence is, waarin deze glucuronzuur-verbinding oplost. Verder is bekend, dat het hippuurzuur voor een groot deel uit de urine verwijderd kan worden door toevoeging van sterke minerale zuren (Kobert [4]). Wij zijn daarom als volgt te werk gegaan.

Aan de urine van den proefdag (eerste 8 uur) wordt ge-

concentreerd salpeterzuur of zwavelzuur (2 % van het volume) toegevoegd, waardoor het hippuurzuur voor een groot deel neerslaat. Men plaatst het mengsel 24 uur of langer in een ijskast, waarna men filtreert.

50 cc. van het urinefiltraat schudt men met 6 × 50 cc. aethylacetaat, verzamelt de 5 porties in een Erlemeyerkolf van 500 cc. en destilleert alsdan af. Men houdt een olieachtige substantie en kristallen, van het hippuurzuur afkomstig, over. De olieachtige vloeistof blijkt nu de qualitatieve proeven van het glucuronzuur in een veel sterkere mate te vertoonen dan de natieve urine. We zien hieruit, dat de glucuronzuur-verbinding (of hare splitsingsproducten) op deze wijze in meer geconcentreerden vorm is verkregen.

Zooals bekend is, draaien het vrije glucuronzuur en zijn zouten rechts, daarentegen de gepaarde glucuronzuren en hunne zouten links. Een uitzondering vormt het benzoylglucuronzuur in de natieve urine van schapen (die men een groote dosis benzoëzuur toegediend heeft), dat volgens Magnus Levy rechts draait.

Onze glucuronzuur-verbinding draaide in de natieve urine van den proefdag meestal zwak links (haast nooit rechts) of was inactief.

Lost men de olieachtige substantie, die verkregen is door de urine met aethylacetaat uit te schudden en daarna de aethylacetaat af te destilleeren, in koud water op en filtreert daarna, dan vindt men soms reeds een rechtsdraaiïng, terwijl de natieve urine links draait. Een verklaring hiervoor is eenvoudig: bij het afdestilleeren is de glucuronzuurverbinding gesplitst en het vrij gekomen glucuronzuur draait rechts.

Wanneer de oplossing echter nog niet rechts draait, maar inactief is of zelfs zwak links draait, zoo verkrijgt men zeker een rechtsdraaiïng, wanneer men de oplossing gedurende een half uur op het waterbad verwarmt.

Resumeerende hebben wij dus in talrijke gevallen het volgende waargenomen.

De urine van den voordag draait het vlak van den polarimeter niet of hoogstens eenige 100ste graden links; dit verschijnsel kan iedere normale urine vertoonen.

De natieve urine van de eerste 8 uur van den proefdag (na toediening van 15 gr. benzoas natricus) draait een enkelen keer rechts, soms is zij inactief, maar meestal leest men op den polarimeter een linksdraaiïng af van 0,06—0,12°; de linksdraaiïng in deze urine is echter steeds grooter dan die, welke wij bij de urine van den voordag vinden. Dit komt niet overeen met de resultaten van Magnus Levy, die gevonden heeft, dat de natieve urine van schapen, na toediening van een groote dosis benzoas natricus, rechts draait. Indien dus bij den mensch evenals bij het schaap na het toedienen van een groote dosis benzoas natricus een rechtsdraaiende glucuronzuur-verbinding wordt uitgescheiden, dan moeten in de urine van den mensch linksdraaiende stoffen aanwezig zijn of ontstaan, die deze rechtsdraaiende glucuronzuur-verbinding neutraliseeren. Uit het draaiïngsvermogen van de natieve urine van de eerste 8 uur van den proefdag kan men dus geen conclusies trekken; wij behandelen daarom de urine op verschillende wijze, om te zien of wij dan tot een resultaat kunnen komen.

A.

1e. Men voegt aan 50 cc. natieve urine van den proef-

dag (1e 8 uur) 1 cc. geconcentreerd zwavelzuur *) toe en kookt dit mengsel gedurende 2 uur in een Erlemeyerkolf met een langen koeler. Het is bekend, dat alle gepaarde glucuronzuren door minerale zuren bij verwarming gesplitst worden. Behandelt men de natieve urine op deze wijze, dan neemt men na koken steeds een rechtsdraaiïng waar, die overeenkomt met 0,1—0,54 % (op glucose berekend).

2e. Aan 50 cc. natieve urine van den proefdag (1e 8 uur), die 2—3 maal verdund is, wordt 2 % geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd; vervolgens verwarmt men dit mengsel op een waterbad gedurende 3 uur.

Ook op deze wijze behandeld, ziet men een rechtsdraaiïng van 0,1—0,54 % ontstaan (op glucose berekend).

3e. Aan 50 cc. natieve urine wordt 1 cc. geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd, waarna men het mengsel onder druk op een waterbad gedurende 1 uur verwarmt. Wij vinden in alle urines, die wij op deze wijze onderzocht hebben, een rechtsdraaiïng, overeenkomend met 0,10 tot 0,54% (op glucose berekend).

B.

Wanneer wij nu aan de natieve urine geconcentreerd zwavelzuur of salpeterzuur toevoegen, het mengsel gedurende 24 uur in een ijskast plaatsen, filtreeren, met aethylacetaat extraheeren en de aethylacetaat afdestilleeren (zooals hierboven op bldz. 22 besproken is) en daarna de olieachtige substantie op dezelfde drie wijzen behandelen als

*) Mayer en C. Neuberg[41] voegen niet meer dan 1—2 % geconcentreerd zwavelzuur toe, daar hen gebleken is, dat grootere hoeveelheden het glucuronzuur splitsen, waardoor men tot foutieve waarnemingen bij de bepaling van de draaiïng komt.

onder A. 1, 2 en 3, dan verkrijgen wij steeds een niet onbelangrijke rechtsdraaiïng. Bovendien krijgen wij soms een rechtsdraaiïng van de opgeloste olieachtige substantie vóór deze verwarmd is. (zooals hierboven reeds is opgemerkt)

Terwijl ons de draaiïng van de natieve urine niet veel geleerd heeft, zien wij, dat de urine, die wij met minerale zuren behandelen en op verschillende wijzen verwarmen (waardoor splitsing van de stof ontstaat) een rechtsdraaiïng vertoont, varieerende tusschen 0,10 en 0,54% (op glucose berekend). Dit is een zeer krachtig argument voor de hypothese, dat in de urine van den proefdag een gebonden glucuronzuur aanwezig is.

Al deze qualitatieve proeven hebben wij meer dan 40 malen verricht en steeds dezelfde resultaten verkregen.

Wij maken attent op het feit, dat de urine, die vóór de toediening van de benzoas natricus geloosd was, de reacties van Fehling, Nylander, naphtoresorcine, orcine en phloroglucine niet vertoonde; de urine van de tweede 8 uur evenmin.

Het is bekend, dat Magnus Levy [6] in de urine van schapen dezelfde qualitatieve veranderingen zag ontstaan, wanneer hij de dieren een groote dosis benzoas natricus (15 gr. en meer) liet gebruiken.

Dakin [13] c.s. en Lewis [44] zagen daarentegen geen of slechts zeer geringe qualitatieve veranderingen in de menschelijke urine ontstaan, na toediening van 5—10 gr. benzoas natricus.

Op grond van onze onderzoekingen moeten wij ons, wat de qualitatieve proeven betreft, aan de zijde van Magnus Levy scharen. *De hierboven genoemde reacties met de urine van de eerste 8 uur van den proefdag, na toediening*

van 10—15 gr. benzoas natricus, zijn ongetwijfeld eigenschappen, welke de glucuronzuren vertoonen.

Wij zien dus, dat bij den mensch na toevoer van groote hoeveelheden benzoas natricus, met de urine naast groote hoeveelheden hippuurzuur ook veel glucuronzuur, dat aan een andere stof gepaard is, wordt uitgescheiden. De vraag ligt voor de hand of dus een gedeelte van het benzoëzuur niet aan glycocoll gepaard, d.w.z. als hippuurzuur, maar aan glucuronzuur gepaard wordt uitgescheiden.

Is dit laatste het geval, dan moet in de urine meer benzoëzuur aanwezig zijn dan overeenkomt met het benzoëzuurgehalte van het hippuurzuur.

Alvorens deze vraag te beantwoorden moeten wij eerst een goede methode zoeken:

1e. Om de totale hoeveelheid benzoëzuur in de urine te bepalen, d.w.z. zoowel het benzoëzuur, dat aan glycocoll als het benzoëzuur, dat aan glucuronzuur en eventueel aan andere stoffen gebonden is.

2e. Om de hoeveelheid hippuurzuur in de urine te bepalen.

In het volgende hoofdstuk zal ik de verschillende methoden, die hiervoor in aanmerking komen, uitvoerig bespreken.

HOOFDSTUK IV.

Methodiek der benzoëzuur- en hippuurzuur-bepalingen.

Om de totale hoeveelheid benzoëzuur te bepalen, hebben wij aanvankelijk de gemodificeerde methode van Wiechowski gebruikt; later toen ons gebleken is, dat deze methode te omslachtig was, hebben wij de benzoëzuur-bepalingen verricht volgens de methode van Kingsbury-Swanson. Wij zullen hier ter plaatse beide methoden bespreken.

De gemodificeerde methode van Wiechowski [9].

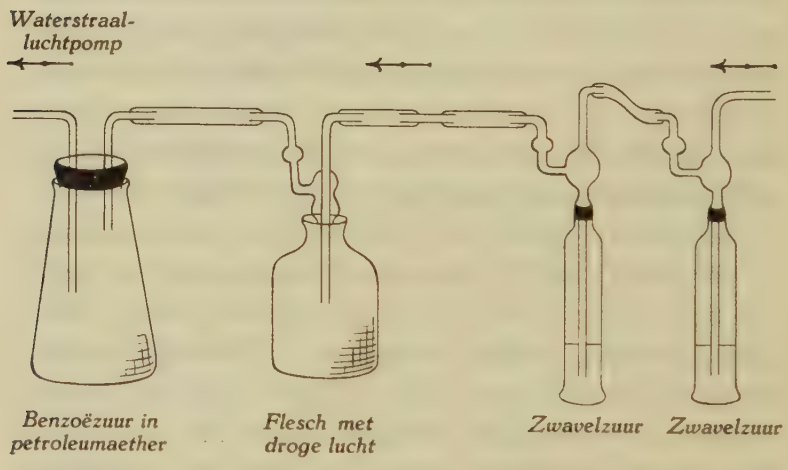
50 cc. urine worden met 12½ gr. NaCl verzadigd, aangezuurd en met 6 × 50 cc. aethylacetaat geschud. Vervolgens voegt men 5 cc. loog van 33 % toe en destilleert af. De toevoeging van loog geschiedt, opdat het benzoëzuur, dat behalve aan glycocoll aan andere stoffen gepaard kan zijn en bij de temperatuur van het afdestilleeren gesplitst zou kunnen worden, niet verloren gaat.

Het residu wordt in 250 cc. gedestilleerd water opgelost, 25 cc. NaOH van 33% toegevoegd, waarna men het mengsel gedurende 10 uur aan een opstijgenden koeler kookt. Hierbij worden al het hippuurzuur en eventueel andere benzoëzuur-verbindingen van de urine in benzoas natricus omgezet. De alkalische vloeistof dampt men vervolgens boven een vrije vlam tot 50 cc. in, voegt zeer voorzichtig zooveel geconcentreerd salpeterzuur toe, totdat een zure reactie verkregen is, schudt de zure vloeistof uit met 6 ×

50 cc. petroleumaether en dampt door middel van een waterstraalluchtpomp (zie hieronder) de gezamenlijke porties af. Het residu wordt opgelost en getitreerd.

Alsdan wordt de getitreerde hoeveelheid benzoëzuur opnieuw zuur gemaakt met phosphorzuur en zoolang aan de stoomdestillatie onderworpen tot men 2 L. destillaat verzameld heeft. Het destillaat wordt alkalisch gemaakt en tot op enkele cc. ingedampt (hetgeen gedurende den nacht in een droogstoof geschieden kan), vervolgens zuur gemaakt en opnieuw met 6 × 50 cc. petroleumaether uitgeschud, verdampt en getitreerd.

De petroleumaether wordt verdampt door middel van een waterstraal-luchtpomp. De lucht laten wij strijken langs twee flesschen met geconcentreerd zwavelzuur en daarna door een flesch met droge lucht, zooals de figuur aangeeft.



Door tusschenschakeling van de flesch met droge lucht is men zeker, dat er geen zwavelzuur mee overgaat. Men

houdt met het verdampen op, zoodra de reuk van den petroleumaether verdwenen is.

Voor het goed gelukken der proeven, welke volgens de methode van Wiechowski verricht worden, zijn enkele voorzorgsmaatregelen noodzakelijk.

1e. Bij het verdampen van den petroleumaether moet een ijskorst aan den wand der kolf ontstaan, om verliezen van het vluchtige benzoëzuur te voorkomen. Om dit te bereiken werd petroleumaether van 28—40° K. P. gebruikt. (Petroleumaether van 40—60° K. P. bleek ondoelmatig te zijn)

2e. Moet de ontwikkeling van den stoom in den kookketel eerst flink aan den gang zijn, alvorens door de kolf geleid te kunnen worden, anders krijgt men te veel water in de Kjeldahlkolf, waarin zich het benzoëzuur bevindt. (zie figuur II)

3e. De omgebogen glazen buis, die uit de Kjeldahlkolf komt (zie figuur II), moet tot in den tweeden bol van den koeler reiken.

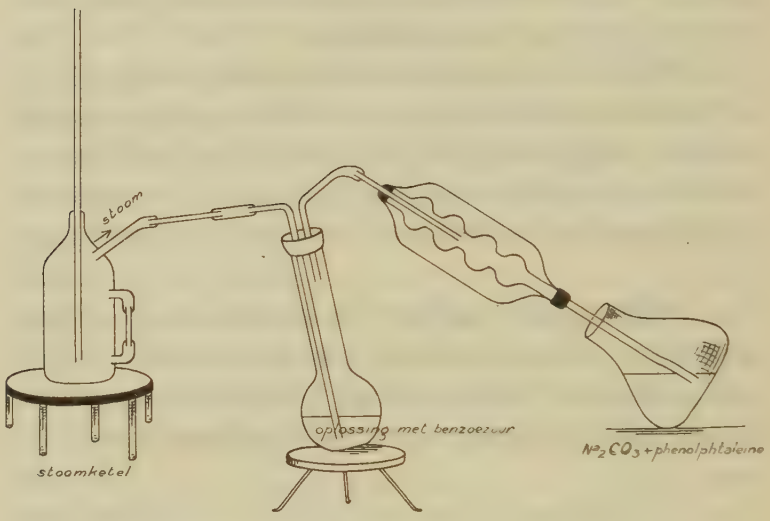
4e. Moet in de kolf met Na-carbonaat, waarin de vloeistof, die door den koeler strijkt, opgevangen wordt, een indicator (phenolphtaleine) aanwezig zijn, om te controleeren of alle benzoëzuur in benzoas natricus omgezet is.

5e. Moet er een verlengstuk aan den koeler bevestigd zijn, dat tot op den bodem der kolf met Na-carbonaat reikt, zoodat de eerste destillatievloeistof direct onder water opgevangen wordt.

6e. Moeten alle onderdeelen van goedsluitende kurken voorzien zijn, hetgeen men het beste bereikt, door ze af te sluiten met collodium.

7e. Men destilleere 2 L. over.

8e. Men neme een Kjeldahlkolf van 300 cc. om den stoom door te leiden.



Nadat al deze veranderingen waren aangebracht, werd de methode nog eens in haar geheel geprobeerd met de hieronder volgende resultaten.

PROEF 1.

We gingen uit van 150 m.gr. benzoëzuur en titreerden deze oplossing. 6,2 cc. NaOH van 0,2055 N. waren hiervoor noodig. Wij bereikten met dit laatste zoowel een contrôle op het gewicht, als een omzetting van benzoëzuur in benzoas natricus, welke laatste goed in water oplosbaar is. Daarna toepassing van de methode van Wiechowski.

We onderzochten den eersten liter, die overgedestilleerd was en vervolgens den tweeden.

Voor den eersten liter destillaat vonden wij na uitschudden met petroleumaether bij titratie, dat 5,75 cc. NaOH 0,2055 N. noodig waren.

Voor den tweeden liter destillaat: 0,25 cc. NaOH van 0,2055 N.

Wij hebben dus van 6,2 cc. NaOH teruggevonden 6 cc. NaOH. Het verlies is dus 0,2 cc. NaOH, hetgeen overeenkomt met 5,01 m.gr. benzoëzuur of 3,22 %.

PROEF II.

We gingen uit van 150 m.gr. benzoëzuur en behandelden deze als bij proef I.

Van 6,2 cc. NaOH van 0,2055 N. (hetgeen overeenkomt met 150 m.gr. benzoëzuur vonden wij terug 5,9 cc. NaOH. Er was dus verloren gegaan 0,3 cc. NaOH, hetgeen overeenkomt met 7,2 m.gr. benzoëzuur of 4,8 %.

PROEF III.

We gingen uit van 150 m.gr. benzoëzuur en behandelden deze als boven.

Van 6,2 cc. NaOH van 0,2055 N. vonden wij terug 6,1 cc. NaOH. Er was dus verloren gegaan 0,1 cc. NaOH, hetgeen overeenkomt met 2,4 m.gr. benzoëzuur of 1,6 %.

Uit bovenstaande proeven bleek duidelijk, dat deze methode bruikbare resultaten opleverde, zoodat wij haar bij onze verdere onderzoekingen meenden te kunnen toepassen.

Nadat enkele bepalingen van het totale benzoëzuurgehalte van de urine met de methode van Wiechowski verricht waren, hebben wij deze methode verlaten, daar zij te omslachtig en tijdroovend bleek te zijn.

In tegenstelling hiermee munt de benzoëzuur-bepaling volgens de methode van Kingsbury-Swanson uit door eenvoud en tijdbesparing. Met deze laatste methode werkende, kan men in 3 à 4 uur de totale hoeveelheid benzoëzuur in de menschelijke urine bepalen.

Methode van Kingsbury-Swanson[21].

Men voegt bij 50 cc. urine 7½ gr. NaOH en ½ gr. MgO in een Kjeldahlkolf van 500—800 cc. inhoud. Het mengsel wordt dusdanig gekookt, dat het volume na een half uur tot op ± 25 cc. is teruggebracht.

Daarna voegt men bij het mengsel, dat nog steeds aan het koken is, 1 cc. 7 % kaliumpermanganaat-oplossing (een oplossing, die bij kamertemperatuur verzadigd is), terwijl men er voor moet zorgen, dat er niets van het kaliumpermanganaat in den hals der kolf achterblijft; anders spuite men dit met een weinig gedestilleerd water in de kolf. Het mengsel wordt zachtjes gedurende twee minuten gekookt, afgekoeld onder de kraan en met een goedsluitenden koeler in den hals der kolf afgesloten. Men late nu 30 cc. geconcentreerd salpeterzuur door den koeler voorzichtig in de kolf loopen. Het mengsel, dat na toevoeging van het salpeterzuur helder wordt, kookt men nu gedurende 45 minuten. Men koke de vloeistof zachtjes onder een kleine vlam. (30 minuten waren reeds voldoende om bevredigende resultaten te verkrijgen, maar een minder sterk gekleurd extract wordt verkregen, wanneer men het mengsel gedurende 45 minuten laat koken) Daarna spoelt men den koeler flink na met 25 cc. warm gedestilleerd water, om verliezen van eventueel gesublimeerd benzoëzuur te voorkomen, waarna men de kolf met het mengsel afkoelt.

De extractie met chloroform, die hierop volgt, is dezelfde als die, welke Folin en Flanders [20] bij hunne methode gebruikt hebben.

De inhoud der kolf wordt quantitatief overgegoten in een scheitrechter van 500 cc. inhoud, die 25 gr. ammoniumsulfaat bevat. Nadat het ammoniumsulfaat opgelost is, wordt geëxtraheerd met successievelijk 50, 35 en 2 × 25 cc. neutrale, goed gewasschen chloroform. De eerste twee porties chloroform worden gebruikt om de Kjeldahlkolf na te spoelen.

De gezamenlijke extracten, die in een tweeden scheitrechter worden verzameld, wascht men met 100 cc. zoutsolutie van Folin en Flanders (1 cc. geconcentreerd zoutzuur op 2 L. verzadigde zoutsolutie) en daarna brengt men door een droog filter de chloroform in een droge Erlemeyerkolf van 500 cc. over. De scheitrechter, waarin het extract geweest is, wordt met 20 cc. chloroform nagespoeld. Deze 20 cc. worden in een smal bekerglaasje overgebracht, waarin van te voren het natte filter van zooeven is gedeponeerd. Dat filter wordt op deze wijze nog eens goed uitgetrokken met chloroform en deze wordt door een ander droog filter bij de overige chloroform in de Erlemeyerkolf gegoten. Men voegt dan aan de chloroform 4 druppels 1% phenolphtaleine in absoluten alcohol toe en titreert het benzoëzuur, dat in den chloroform aanwezig is, met 0,1 N. Na-aethylaat.

Het Na-aethylaat wordt bereid volgens de methode van Folin en Flanders, die in hunne origineele publicatie eveneens beschrijven, hoe men den titer hiervan bepaalt.

Bereiding van het Na-aethylaat.

Het Na-aethylaat, dat men bij de titratie gebruikt, be-

reidt men door 2,3 gr. metallisch natrium in 1 L. absoluten alcohol op te lossen. Het is gewenscht deze Na-aethylaat niet sterker dan 0,1 N. te maken. De normaliteit van het Na-aethylaat vindt men door een bekende hoeveelheid benzoëzuur in chloroform op te lossen en hierbij Na-aethylaat uit een buret te laten druppelen, tot de omslag bereikt is. Men gebruikt phenolphtaleine als indicator.

Bepaling van den titer van het Na-aethylaat.

Men neemt 100 m.gr. chemisch zuiver benzoëzuur, dat in een exsiccator gedroogd is, lost dit op in 100—200 cc. chloroform en titreert met het Na-aethylaat van onbekenden titer. Veronderstel, men heeft voor de titratie 8 cc. Na-aethylaat noodig, dan kan men den onbekenden titer zeer gemakkelijk vinden.

8 cc. Na-aethylaat is noodig voor 100 m.gr. benzoëzuur.
1 cc. Na-aethylaat van 0,1 N. = 12,2 m.gr. benzoëzuur.

De onbekende titer is dus: $\frac{100}{12{,}2 \times 8} \times 0{,}1 = 0{,}102$ N.

Wij hebben geen titratie met HCl van bekende sterkte verricht, aangezien men hiermee steeds fouten maakt.

De troebeling van het Na-aethylaat, die na het staan optreedt, is toe te schrijven aan Na-carbonaat: deze schijnt echter niet van invloed te zijn, wanneer men in chloroform titreert. Toch doet men goed om steeds den titer van het Na-aethylaat vóór iedere proef te bepalen; men ziet n.l. zoo nu en dan verschillen optreden, die, daar men met 50 cc. urine of minder werkt, kleinere of grootere fouten in de berekening over de totale hoeveelheid urine doen ontstaan, welke men bij bovenstaande contrôle van den titer vermijdt.

Kingsbury en Swanson geven tevens aan, hoe men gebruikte chloroform weer voor nieuwe proeven zuiver kan maken. Ziehier hunne methode:

De chloroform, die bij de analyses gebruikt is en daardoor Na-benzoaat en alcohol bevat, wordt eerst door een droog filter gefiltreerd, waardoor een belangrijk deel van het Na-benzoaat achterblijft. Men wascht het filtraat met een gelijke hoeveelheid gewoon water, daarop met een gelijke hoeveelheid water, die 5—10 cc. loog bevat, vervolgens herhaalt men ditzelfde nog eens met 5—10 cc. loog, waarna men twee maal met een gelijke hoeveelheid gewoon water zonder toevoeging van loog wascht, om tot slot met gedestilleerd water de zes wasschingen te beëindigen. De op deze wijze verkregen chloroform reageert neutraal, hetgeen door de volgende proef bewezen wordt.

155 cc. chloroform (hetgeen meestal de hoeveelheid is, die men bij de hierboven beschreven methode gebruikt) schudt men met verdund salpeterzuur, verwijdert dit laatste en wascht vervolgens met de zoutsolutie van Folin en Flanders, waarna men door een droog filter filtreert en titreert. Bij de titratie mag niet meer dan 0,1 cc. van 0,1 N. Na-aethylaat gebruikt worden.

(Men wachte niet te lang met het reinigen van de onzuivere chloroform, daar dan een gele kleur van deze oplossing ontstaat, die bij het reinigen moeilijk verdwijnt, terwijl er hierdoor tevens een neiging tot emulsie-vorming bestaat. Door een en ander krijgt men verliezen van de dure chloroform, die men door spoedige reiniging kan voorkomen.)

Om het totale benzoëzuur-gehalte met de methode van Kingsbury-Swanson te kunnen bepalen moet de urine

vrij van eiwit zijn; de schrijvers behandelen de eiwitbevattende urine op de volgende wijze:

De eiwit-bevattende urine wordt opgevangen in 2 % salpeterzuur, dat in deze sterkte geen invloed op het hippuurzuur uitoefent (Raiziss en Dubin[48]).

15 cc. van de 2 % salpeterzuur bleek voldoende te zijn voor een hoeveelheid urine, die ongeveer in 3 uur kan worden opgevangen.

Bij 50 cc. van deze urine voegt men 3 à 4 druppels 0,1% methylroodoplossing in alcohol en voegt loog toe, totdat een lichtgele kleur ontstaat. Het mengsel wordt dan gekookt en gedurende het koken 0,1 N. HCl toegevoegd, tot de eerste definitieve roode omslag wordt verkregen. Op deze wijze wordt het eiwit quantitatief neergeslagen, zoodat er dus bij het titreeren geen fouten ontstaan. Het praecipitaat van het eiwit wordt nu op een filter tweemaal met 50 cc. kokend water uitgewasschen. De gecombineerde waschwaters en het filtraat worden, nadat men het licht alkalisch heeft gemaakt door toevoeging van verdunde loog, in een Kjeldahlkolf van 800 cc. boven een vrije vlam vlug verdampt. Stooten en andere onaangename nevenverschijnselen voorkomt men door kooksteentjes en een druppel caprylalcohol toe te voegen. Wanneer de inhoud van de kolf tot 50 cc. ingedampt is, voegt men $7\frac{1}{2}$ gr. NaOH en $\frac{1}{2}$ gr. MgO toe en de verdere manupulaties verricht men, zooals hierboven is beschreven.

Wij hebben gemeend de volgende kleine wijziging bij het uitschudden met de chloroform te moeten aanbrengen.

Wanneer wij de zure oplossing achtereenvolgens met 50, 35 en 2×25 cc. chloroform behandeld en in een scheitrechter verzameld hebben, schudden wij de gezamenlijke

porties chloroform krachtig uit en laten deze daarna vijf minuten staan. Kleine porties van de zure waterige oplossing, die aan den wand van den scheitrechter blijven kleven en bij het overgieten met de chloroform zijn meegegaan, worden door het schudden van de chloroform afgescheiden. Wij laten alsdan het chloroform-mengsel door een filter quantitatief in een tweeden scheitrechter loopen, voegen 100 cc. zoutsolutie van Folin en Flanders toe, schudden flink en laten het mengsel 10 minuten staan. Daarna brengen wij het chloroform-mengsel door een droog filter in een Erlemeyerkolf van 500 cc. over, spoelen het gebruikte filter in een bekerglas van 100 cc. met 50 cc. chloroform na en alsdan gieten wij deze 50 cc door een ander droog filter bij de overige chloroform in de Erlemeyerkolf, waarna wij titreeren.

Wij laten hier een protocol volgen van een onderzoek volgens de methode van Kingsbury-Swanson.

De urine van een patiënt, die 15 gr. benzoas natricus gebruikt heeft, wordt gedurende 8 uur opgevangen. 2×25 cc. van deze urine behandelen wij nu volgens de methode van Kingsbury-Swanson.

Bij titratie vinden wij, dat voor de eerste 25 cc. urine 18,45 cc. Na-aethylaat van 0,09686 N. noodig zijn.

Voor de tweede 25 cc. vinden wij 18,55 cc. Na-aethylaat.

Gemiddeld is dus in 25 cc. urine een hoeveelheid benzoëzuur aanwezig, welke overeenkomt met 18,5 cc. Na-aethylaat van 0,09686 N.

1 cc. Na-aethylaat van 0,1 N. = 12,2 m.gr. benzoëzuur.
18,5 cc. Na-aethylaat van 0,09686 N. =

$$\frac{18{,}5 \times 0{,}09686 \times 12{,}2 \text{ m.gr.}}{0{,}1} = 218{,}5 \text{ m.gr. benzoëzuur.}$$

In 25 cc. urine zijn dus aanwezig 218,5 m.gr. benzoëzuur. De hoeveelheid urine van de eerste 8 uur bedraagt 1230 cc.

In 1230 cc. urine zijn aanwezig $\frac{1230}{25} \times 218{,}5$ m.gr. = 10,750 gr. benzoëzuur.

De methode van Kingsbury-Swanson blijkt zeer goed te voldoen; daarbij is zij te verkiezen boven de andere methoden, doordat er veel minder tijd mee gemoeid gaat. Met de oorspronkelijke methode van Folin en Flanders werkende, heeft men 24 uur noodig voor een bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte in de urine, terwijl men met de methode van Kingsbury-Swanson, wanneer alle ingrediënten zuiver en in voldoende mate beschikbaar zijn, in 3 uur tot een resultaat kan komen. Verder is het een groot voordeel, dat men met de methode van Kingsbury-Swanson de geheele proef in één kolf tot het einde toe kan verrichten en alleen eenige scheitrechters noodig heeft om de chloroform uit te schudden.

Om het hippuurzuur in de urine te bepalen hebben wij de methode van Snapper-Laqueur gebruikt, welke wij hier ter plaatse uitvoerig zullen bespreken.

Methode van Snapper-Laqueur[47].

De urine wordt eerst op eiwit onderzocht en indien noodig met phosphorzuur onteiwit. Men voegt dan bij 50 cc. afgepipetteerde urine 12,5 gr. keukenzout. (om te zorgen, dat er zich geen emulsie vormt bij het uitschudden met aethylacetaat) Wij schudden tot het keukenzout opgelost is en voegen daarna 0,6 cc. HCl van 38% toe, om alle hippuraten in hippuurzuur om te zetten. Daarna schudt men

gedurende 1 minuut in een scheitrechter deze 50 cc. urine met 50 cc. aethylacetaat en wacht, tot de twee vloeistoflagen zich gescheiden hebben, waarna men de urine laat afloopen. (Na het eerste schudden onderzoekt men den zuurgraad van de urine met congo-papier, dat een intensief blauwe kleur moet vertoonen, anders voege men nog eens HCl toe)

Men schudt deze urine nog 5 maal met 50 cc. aethylacetaat uit en giet de gezamenlijke hoeveelheid aethylacetaat in een anderen scheitrechter over. Dan worden de 300 cc. aethylacetaat gedurende 1 minuut krachtig met 75 cc. verzadigde zoutsolutie geschud en nadat de twee vloeistoflagen zich gescheiden hebben, laat men de zoutsolutie afloopen. Deze laatste wordt in een nieuwen scheitrechter gedurende 1 minuut nog eens flink met een gelijke hoeveelheid versche aethylacetaat geëxtraheerd. Deze hoeveelheid aethylacetaat voegt men bij de eerste 300 cc.

Wanneer er bij de schudding eene emulsie ontstaat, laat men deze met de aethylacetaat in den tweeden scheitrechter overgaan; bij het wasschen met de zoutsolutie verdwijnt deze emulsie, wanneer zij niet reeds eerder door het staan verdwenen is.

Men destilleert nu de aethylacetaat af tot droog en men verkrijgt zoodoende, wanneer veel hippuurzuur aanwezig is, mooie hippuurzuur-kristallen. Dit residu wordt nu met een mengsel van alcohol en aethylacetaat in een maatkolf van 50 cc. opgelost en nadat het mengsel door goed schudden homogeen geworden is, pipetteert men hiervan 2×20 cc. af, giet deze twee hoeveelheden in twee Kjeldahlkolven en dampt in tot droog. Aan de beide Kjeldahlkolven, die ieder 20 cc. mengsel bevatten, voegt men 10 cc. broom-

loog toe, waarna men gedurende 3 minuten schudt om de ureum-stikstof te verwijderen. Men voegt alsdan een mengsel van K_2SO_4 en $CuSO_4$ (van ieder een schepje), 5 cc. H_2SO_4 en een paar kooksteentjes toe, waarna het mengsel in de zuurkast geheel wordt verasch t.

Als de vloeistof in de Kjeldahlkolf helder blauw ziet (er mogen geen zwarte stukjes in zweven) koelt men af. De inhoud wordt quantitatief in een koperen kolf overgegoten met 200 cc. H_2O.

Men voegt alsdan 50 cc. NaOH van $33^1/_2\%$ toe, waarna de ammoniak, die vrij komt, in een kolf overgedestilleerd wordt, die een bepaald volume 1/50 N. H_2SO_4 bevat. Wanneer men ongeveer 100 cc. destillaat in de kolf verzameld heeft, kan de proef als beëindigd beschouwd worden en moet het door de ammoniak verbruikte aantal cc. 1/50 N. H_2SO_4 door titratie met 1/50 N. NaOH berekend worden.

Alvorens over te gaan tot verdere berekening, moeten eerst nog eenige kleine fouten, die eventueel gemaakt kunnen worden, besproken worden.

1e. Met het oog op de kleine hoeveelheid ammoniak doet men goed, in plaats van een glazen kolf een koperen te gebruiken voor de laatste destillatie.

2e. Men overtuige zich van te voren van de zuiverheid van het water.

3e. De praeparaten K_2SO_4 en $CuSO_4$ moeten onderzocht worden of zij vrij van ammoniak zijn.

Al de hier genoemde punten kunnen aanleiding geven tot fouten, aangezien men titreert met 1/50 N. oplossing. Blinde proeven zijn dus wel gewenscht, alvorens met de methode te werken.

De onderzoekers vonden, dat deze fouten varieeren tusschen 0,3 en 0,6 cc. 1/50 N. NaOH.

Wij berekenen de hoeveelheid hippuurzuur, die in 50 cc. aanwezig is, als volgt:

Stel, dat in de ontvangkolf 25 cc. 1/50 N. zwavelzuur aanwezig was en bij terugtitratie met 1/50 N. NaOH blijkt, dat 15 cc. 1/50 N. zwavelzuur door de ammoniak verbruikt is, dan kunnen wij hieruit de hoeveelheid stikstof resp. de hoeveelheid hippuurzuur berekenen, die in 50 cc. urine aanwezig is.

15 cc. 1/50 N. H_2SO_4 komt overeen met 15 $\times$ 0,28 m.gr. stikstof = 4,2 m.gr. stikstof.

4,2 m.gr. stikstof correspondeert met 4,2 $\times$ 12,78 m.gr. = 53,7 m.gr. hippuurzuur.

Deze hoeveelheid hippuurzuur is dus in 20 cc. aethylacetaat alcohol-mengsel aanwezig.

Wij zijn uitgegaan van 50 cc. aethylacetaat alcoholmengsel; in deze 50 cc., waarin de hoeveelheid hippuurzuur opgelost is, die in 50 cc. urine voorkomt, zijn dus 53,7 $\times$ 2,5 m.gr. = 134,25 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

Op de totale hoeveelheid urine omgerekend bevindt zich in 600 cc. $\frac{600}{50} \times$ 134,25 m.gr. hippuurzuur = 1,611 gr. hippuurzuur.

Het gevaar bij deze methode is, dat andere stikstofhoudende stoffen, behalve hippuurzuur, in de aethylacetaat zouden kunnen overgaan.

Men zorge er dus voor, dat tijdens deze proeven de patiënten geen medicamenten (Salicylpraeparaten, Veronal e.a.) gebruiken. Ook bij icterische urines is voorzichtigheid

geboden, omdat de galzuren aanleiding tot fouten kunnen geven.

Van groot belang is het feit, dat bij het uitschudden van de urine met aethylacetaat ureum in den azijnaether kan overgaan. Bijna alle ureum wordt echter door het uitwasschen van de 300 cc. aethylacetaat met 75 cc. verzadigde NaCl-oplossing verwijderd. Gemiddeld blijft in de aethylacetaat niet meer dan 2,5 m.gr. ureum achter. Dit ureum wordt dan vernietigd door toevoeging van broomloog, die de stikstof van het ureum als gas doet ontwijken.

De ervaring leert ons echter, dat er 7 % van het ureum door de broomloog niet gesplitst wordt, zoodat in 20 cc. aethylacetaat alcohol-mengsel na behandeling met broomloog aan ureum-stikstof aanwezig is:

$$\frac{20}{50} \times \frac{7}{100} \times \frac{2,5}{0,28} \text{ cc.} = 0,23 \text{ cc. } 1/50 \text{ N. NaOH.}$$

Deze hoeveelheid moet dus van de bovengenoemde 15 cc. afgetrokken worden.

Er ontsnapt dus slechts een minimale hoeveelheid aan de broomloog-splitsing, zoodat, wanneer er veel hippuurzuur in de urine aanwezig is, zooals bij onze proeven het geval is, deze hoeveelheid ureum geen invloed uitoefent op de waarde, welke wij voor de hoeveelheid hippuurzuur vinden.

Het getal 12,78 wordt verkregen door het moleculairgewicht van het hippuurzuur door het atoomgewicht van de stikstof te deelen.

Wanneer de urine eiwit bevat, moet men dit eerst verwijderen door koken, onder toevoegen van enkele druppels phosphorzuur. (Niet met azijnzuur, daar dit in azijnaether oplost. Men doet daarom goed den azijnaether voor

het gebruik met gedestilleerd water te schudden, om eventueel aanwezig azijnzuur te evacueeren) De onderzoekers waarschuwen er voor, de urine niet voor het gebruik door indampen te concentreeren, daar dan splitsing van hippuurzuur optreedt, een feit, waarop Folin en Flanders ook reeds gewezen hebben.

Snapper-Laqueur vangen de urine op in een mengsel, bestaande uit een gelijke hoeveelheid chloroform en toluol, om zoodoende de splitsing door bacteriëele invloeden te vermijden.

Met deze methode verkrijgt men ook goede resultaten, wanneer er weinig hippuurzuur in de urine aanwezig is, b.v. bij melk en pap-diëet.

Alvorens met de bovengenoemde methoden van Kingsbury-Swanson en Snapper-Laqueur te werken, hebben wij ons eerst door blinde proeven overtuigd, dat hiermee goede en onderling vergelijkbare resultaten verkregen kunnen worden. Wij laten hier eenige blinde proeven volgen, die volgens de methode van Kingsbury-Swanson verricht zijn.

PROEF I.

In een Kjeldahlkolf van 500 cc. inhoud voegt men 200 m.gr. hippuurzuur, 500 m.gr. MgO en 7,5 gr. NaOH bij elkaar, lost dit op in 50 cc. water en behandelt het mengsel verder volgens de methode van Kingsbury-Swanson. (Zie Methodiek)

Na uitschudding met chloroform is bij de titratie 11,95 cc. natrium-aethylaat 0,094 N. noodig; hetgeen overeenkomt met 137 m.gr. benzoëzuur; d.i. 200,9 m.gr. hippuurzuur.

We zijn uitgegaan van 200 m.gr. hippuurzuur, dus een verschil van slechts 0,9 m.gr. (gelijk aan 0,5 %)

PROEF II.

We gaan uit van 200 m.gr. hipp.z. en vinden terug 200 m.gr. hipp.z., d.i. 0 % verlies.

PROEF III.

We gaan uit van 200 m.gr. hipp.z. en vinden terug 199 m.gr. hipp.z., d.i. 0,5 % verlies.

PROEF IV.

We gaan uit van 200 m.gr. hipp.z. en vinden terug 199 m.gr. hipp.z., d.i. 0,5 % verlies.

Uit deze 4 proeven blijkt, dat men met de methode van Kingsbury-Swanson bij waterige benzoëzuur-oplossingen bevredigende resultaten verkrijgt.

Met de methode van Kingsbury-Swanson bepalen wij de totale hoeveelheid benzoëzuur, welke behalve aan glycocoll ook aan andere stoffen gepaard is; met de methode van Snapper-Laqueur berekenen wij alleen het hippuurzuur, dat in de menschelijke urine aanwezig is. Aangezien wij aanstonds de resultaten, welke de beide methoden opleveren, met elkaar willen vergelijken, was het gewenscht om eerst door blinde proeven met normale urine, waaraan een bekende hoeveelheid hippuurzuur was toegevoegd, na te gaan of men werkelijk de resultaten van deze beide methoden met elkaar vergelijken mag. Wij zijn als volgt te werk gegaan:

PROEF I. A.

In een Kjeldahlkolf van 500 cc. giet men 50 cc. normale urine, voegt 7,5 gr. NaOH, 500 m.gr. MgO en alsdan 180 m.gr. hippuurzuur toe, waarna het mengsel volgens de methode van Kingsbury-Swanson verder behandeld wordt.

Bij titratie vindt men, dat er 12,55 cc. Na-aethylaat van 0,0925 N. noodig zijn.

Voor de contrôle-proef zijn 12,60 cc. Na-aethylaat noodig.

In 50 cc. urine vindt men dus gemiddeld 142 m.gr. benzoëzuur, hetgeen overeenkomt met 208 m.gr. hippuurzuur.

PROEF I. B.

Wanneer wij 50 cc. van dezelfde normale urine zonder toevoeging van hippuurzuur volgens de methode van Kingsbury-Swanson op de totale hoeveelheid benzoëzuur onderzoeken, vinden wij bij titratie, dat wij 2,00 cc. Na-aethylaat van 0,0925 N. noodig hebben en voor de contrôle-proef 2,05 cc.

Gemiddeld zijn dus in 50 cc. urine

$$\frac{2{,}00 + 2{,}05}{2} \times 122 \times 0{,}0925 \text{ m.gr.} = 23 \text{ m.gr.}$$ benzoëzuur of omgerekend op hippuurzuur $\frac{179}{122} \times 23$ m.gr. = 34 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

Wij vinden dus terug 208 m.gr. — 34 m.gr. = 174 m.gr. hippuurzuur, m.a.w. er zijn 6 m.gr. van de 180 m.gr. hippuurzuur verloren gegaan.

Wanneer wij nu van dezelfde urine 2 × 50 cc. afpipetteeren en onderzoeken volgens de methode van Snapper-

Laqueur ná toevoeging en zonder toevoeging van hippuurzuur, dan vinden wij:

PROEF I. C.

In 50 cc. urine, waaraan 180 m.gr. hippuurzuur toegevoegd is, zijn 208 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

PROEF I. D.

In 50 cc. urine, waaraan geen hippuurzuur is toegevoegd, zijn aanwezig 34 m.gr. hippuurzuur.

Uit proef I. C. en I. D. volgt, dat wij van de toegevoegde 180 m.gr. hippuurzuur 174 m.gr. terugvinden, m.a.w. er zijn 6 m.gr. hippuurzuur verloren gegaan.

PROEF II. A.

In 50 cc. urine, waaraan 250 m.gr. hippuurzuur toegevoegd waren, zijn volgens de methode van Kingsbury-Swanson 204,5 m.gr. benzoëzuur of omgerekend op hippuurzuur 300 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

PROEF II. B.

In 50 cc. normale urine zijn aanwezig 34 m.gr. benzoëzuur of omgerekend op hippuurzuur 49,4 m.gr. hippuurzuur.

Wij vinden dus volgens de methode van Kingbury-Swanson 300 m.gr. — 49,4 m.gr. = 250,6 m.gr. hippuurzuur van de toegevoegde 250 m.gr. hippuurzuur terug.

PROEF II. C.

In 50 cc. van dezelfde urine, waaraan wij 250 m.gr. hippuurzuur toegevoegd hebben, zijn volgens de methode van Snapper-Laqueur 288 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

PROEF II. D.

In 50 cc. normale urine zijn volgens Snapper-Laqueur 35 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

Wij vinden dus 288 m.gr. — 35 m.gr. = 253 m.gr. hippuurzuur van de toegevoegde 250 m.gr. hippuurzuur terug.

PROEF III. A.

In 50 cc. urine zijn, na toevoeging van 70 m.gr. hippuurzuur, volgens de methode van Kingsbury-Swanson 100 m.gr. benzoëzuur of omgerekend 146,5 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

PROEF III. B.

In 50 cc. van dezelfde urine zijn volgens de methode van Kingsbury-Swanson 53 m.gr. benzoëzuur of omgerekend 77,5 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

Wij vinden dus volgens de methode van Kingsbury-Swanson 146,5 m.gr. — 77,5 m.gr. = 69,0 m.gr. hippuurzuur van de toegevoegde 70 m.gr. hippuurzuur terug.

PROEF III. C.

In 50 cc. urine (dezelfde als hierboven) zijn, na toevoeging van 70 m.gr. hippuurzuur, volgens de methode van Snapper-Laqueur 163 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

PROEF III. D.

In 50 cc. van dezelfde urine zijn volgens de methode van Snapper-Laqueur 91,7 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

Wij vinden dus volgens de methode van Snapper-Laqueur 163 m.gr. — 91,7 m.gr. = 71,3 m.gr. hippuurzuur van de toegevoegde 70 m.gr. hippuurzuur terug.

PROEF IV. A.

In 50 cc. urine, waaraan 90 m.gr. hippuurzuur toegevoegd zijn, bevinden zich volgens de methode van Kingsbury-Swanson 76 m.gr. benzoëzuur of omgerekend 111 m.gr. hippuurzuur.

PROEF IV. B.

In 50 cc. van dezelfde urine zijn volgens de methode van Kingsbury-Swanson 15,5 m.gr. benzoëzuur of omgerekend 22,5 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

Wij vinden dus 111 m.gr. — 22,5 m.gr. = 88,5 m.gr. hippuurzuur van de toegevoegde 90 m.gr. hippuurzuur terug.

PROEF IV. C.

In 50 cc. van dezelfde urine zijn, na toevoeging van 90 m.gr. hippuurzuur, volgens de methode van Snapper-Laqueur, 115 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

PROEF IV. D.

In 50 cc. van deze urine zijn volgens de methode van Snapper-Laqueur 30 m.gr. hippuurzuur aanwezig.

Wij vinden dus volgens de methode van Snapper-Laqueur 115 m.gr. — 30 m.gr. = 85 m.gr. hippuurzuur van de toegevoegde 90 m.gr. hippuurzuur terug.

Uit de protocollen I—IV blijkt ons dus, dat, wanneer wij aan een urine een bekende hoeveelheid hippuurzuur toevoegen, wij deze hoeveelheid ongeveer quantitatief terugvinden, zoowel met de methode van Kingsbury-Swanson als met die van Snapper-Laqueur.

Hieruit volgt, dat, wanneer al het benzoëzuur, dat in de urine aanwezig is, als hippuurzuur hierin zou voorkomen, de uitkomsten volgens de methode van Kingsbury-Swanson (benzoëzuur-bepaling) precies dezelfde zouden moeten zijn als die volgens Snapper-Laqueur (hippuurzuur-bepaling). Mocht echter een gedeelte van het toegevoerde benzoëzuur niet als hippuurzuur, maar gebonden aan andere stoffen worden uitgescheiden, dan moet de methode van Kingsbury-Swanson hoogere waarden geven dan de methode van Snapper-Laqueur.

Uit het feit, dat de hoeveelheid toegevoegde hippuurzuur zoowel met de methode van Kingsbury-Swanson als volgens Snapper-Laqueur nauwkeurig teruggevonden wordt, volgt omgekeerd, dat, indien in de urine de methode van Kingsbury-Swanson hoogere waarden geeft dan de methode van Snapper-Laqueur, benzoëzuur gebonden aan andere stoffen dan glycocoll moet worden uitgescheiden.

HOOFDSTUK V.

Proeven met de urine van den Voordag en den Proefdag.

Wij kunnen nu volgens de bovengenoemde methoden (t.w. van Wiechowski, Kingsbury-Swanson aan den eenen kant, van Snapper-Laqueur aan den anderen kant) proeven verrichten met normale urine, zoowel als met de urine van menschen, die een dosis benzoas natricus (10—15 gr.) hebben gebruikt en aldus bepalen:

1e. De totale hoeveelheid benzoëzuur, d.w.z. het benzoëzuur, dat aan glycocoll gebonden is plus het benzoëzuur, dat aan andere stoffen, speciaal glucuronzuur, gebonden is.

2e. De hoeveelheid hippuurzuur en hieruit de hoeveelheid benzoëzuur, dat aan het glycocoll gepaard is.

Wij hebben eenige proeven verricht met de urine van menschen, die 15 gr. benzoas natricus gebruikt hebben, met de methode van Wiechowski, om aldus de totale hoeveelheid benzoëzuur te bepalen, dat behalve aan glycocoll aan andere stoffen gepaard is en met de methode van Snapper-Laqueur, om de hoeveelheid hippuurzuur te berekenen, dat in deze urine aanwezig is. Wij hebben de volgende resultaten verkregen:

De totale hoeveelheid benzoëzuur, welke in deze urine met de methode van Wiechowski gevonden wordt, is grooter dan de hoeveelheid benzoëzuur, dat aan het glycocoll gebonden is. Dit surplus aan benzoëzuur bedraagt ongeveer 7% van de totale hoeveelheid benzoëzuur, welke

in de urine voorkomt, na toediening van 15 gr. benzoas natricus.

Daar wij geen vergelijkende blinde proeven volgens de methoden van Wiechowski en Snapper-Laqueur verricht hebben (waarbij wij uitgaan van een bekende hoeveelheid hippuurzuur), weten wij niet of wij de resultaten, welke met de methode van Wiechowski verkregen worden, kunnen vergelijken met de resultaten, welke wij met de methode van Snapper-Laqueur verkrijgen. Trouwens is de methode van Wiechowski zóó omslachtig en tijdroovend, dat wij met deze ingewikkelde methode slechts enkele proeven verricht hebben en vervolgens de methode van Kingsbury-Swanson gebruikten.

Wij gaan dus na in de urine:

Glucuronzuur-reacties (zie bladz. 20).

Hoeveelheid totaal benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Hoeveelheid benzoëzuur gebonden aan glycocoll (Snapper-Laqueur).

Alles vóór en na het gebruik van groote hoeveelheden benzoas natricus.

Beide proeven worden steeds gelijktijdig verricht, zoodat er van dezelfde urine op hetzelfde oogenblik een bepaald volume voor de proeven gebruikt wordt.

PROEF 1.

15. 11. 1922.

Voordag.

De urine van den patiënt X. wordt gedurende 12 uur opgevangen.

Hoeveelheid urine 1335 cc.; s.g. 1014; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief onderzoek is niet verricht.

PROEFDAG.

16. 11. 1922.

Patiënt gebruikt 15 gr. benzoas natricus, heeft geen klachten.

De urine wordt gedurende de eerste 8 uur na de toediening opgevangen.

Hoeveelheid urine 710 cc.; s.g. 1014; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling.....	Een traag opkomende, langzamerhand sterk wordende positieve reactie.
	Nylander	Positief.
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine ..	„ zwarte band 550—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

Men ziet de streep van het Orcine-spectrum het beste, door de spleet van den spectroscoop te vernauwen en nauwkeurig te letten op de plaats van 620.

De streep is eerst wazig, maar wordt langzamerhand sterker.

De kleur is positief, wanneer zij bruingroen tot groen is.

De oplossing van Fehling, die wij voor onze qualitatieve proeven gebruikten, wordt gevoegd bij een gelijke hoeveelheid urine.

Quantitatief onderzoek 1e 8 uur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc. urine zijn noodig.... 36,65 cc. Na-aethylaat 0,089 N.
Voor 25 cc. urine (contrôle) .... 36,45 cc. Na-aethylaat 0,089 N.

In 710 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 11,312 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 710 cc. urine zijn aanwezig.... A. 15,629 gr. hippuurzuur
B. 15,157 gr. „ ,
gemiddeld dus 15,393 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 10,491 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte in de urine wordt dus 821 m.gr. benzoëzuur meer gevonden dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

De voordag is niet onderzocht op benzoëzuur en hippuurzuur, hetgeen trouwens, zooals men uit het voorafgaande zien kan, aan de onderlinge verschillen niets af doet.

Van de 15 gr. benzoas natricus vindt men in de 1e 8 uur 11,312 gr. benzoëzuur terug, d.i. 89%.

PROEF II.

23. 11. 1922.

Voordag.

Hoeveelheid niet bepaald, s.g. 1018; reactie: zuur; eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

PROEFDAG.

24. 11. 1922.

Patiënt gebruikt 15 gr. benzoas natricus; na een half uur gebraakt.

De urine wordt gedurende de 1e 8 uur opgevangen.

Hoeveelheid urine 600 cc.; s.g. 1020; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Positief (typische reactie)
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine ..	„ zwarte band 550—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc. urine zijn noodig.... 24,1 cc. Na-aethylaat 0,082 N.
Voor 25 cc. urine (contrôle) .... 23,9 cc. Na-aethylaat 0,082 N.

In 600 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 5,762 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 600 cc. urine zijn aanwezig .. A. 7,753 gr. hippuurzuur,
B. 7,846 gr. „ ,
gemiddeld dus 7,8 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 5,316 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte van de urine wordt dus 446 m.gr. benzoëzuur meer gevonden dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

7,7 % van het uitgescheiden benzoëzuur is dus niet aan glycocoll gebonden.

Men ziet verder, dat reeds een ½ uur na toediening van benzoas natricus ongeveer de helft van de dosis is geresorbeerd en dat men hierbij weer een surplus aan benzoëzuur vindt.

PROEF III.

25. 11. 1922.

VOORDAG.

De urine van patiënt Y. wordt gedurende 12 uur opgevangen.

Hoeveelheid urine 1025 cc.; s.g. 1017; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine..	Zwak positief; grijze band 580—600
	Orcine	Negatief.
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig.... 1,95 cc. Na-aethylaat 0,105 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) .... 2,00 cc. Na-aethylaat 0,105 N.

In 1025 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 519 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 1025 cc. urine zijn aanwezig.... A. 756 m.gr. hippuurzuur
B. 756 m.gr. „ ,
gemiddeld dus 756 m.gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 515 m.gr. benzoëzuur.

PROEFDAG.

26. 11. 1922.

Patiënt heeft 15 gr. benzoas natricus gebruikt en niet gebraakt. Gemengd diëet.

De urine wordt opgevangen gedurende 3 × 8 uur.

Urine van de 1e 8 uur.

Hoeveelheid urine 880 cc.; s.g. 1018; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Positief (typische reactie).
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine ..	„ zwarte band 550—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

Quantitatief onderzoek.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc. urine zijn noodig 25,90 cc. Na-aethylaat 0,105 N.
Voor 25 cc. urine (contrôle) 25,75 cc. Na-aethylaat 0,105 N.

In 880 cc. urine zijn dus gemiddeld aanwezig 11,646 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 880 cc. urine zijn aanwezig .... A. 15,712 gr. hippuurzuur
B. 15,536 gr. „ ,
gemiddeld dus 15,624 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 10,648 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte in de urine worden dus 998 m.gr. benzoëzuur meer gevonden dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

8½% van het uitgescheiden benzoëzuur is dus niet aan glycocoll gebonden.

Urine van de 2e 8 uur.

Hoeveelheid urine 225 cc.; s.g. 1018; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc. urine zijn noodig .. 3,35 cc. Na-aethylaat 0,101 N.
Voor 25 cc. urine (contrôle) .. 3,30 cc. Na-aethylaat 0,101 N.

In 225 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 369 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 225 cc. urine zijn aanwezig..... A. 418 m.gr. hippuurzuur
B. 420 m.gr. „ ,
gemiddeld dus 419 m.gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 286 m.gr. benzoëzuur.

Wij vinden dus hier een surplus van 83 m.gr. benzoëzuur.

Urine van de 3e 8 uur.

Hoeveelheid urine 600 cc.; s.g. 1018; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig ..... 3,30 cc. Na-aethylaat 0,1 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) .... 3,28 cc. Na-aethylaat 0,1 N.

In 600 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 483 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 600 cc. urine zijn aanwezig .... A. 616 m.gr. hippuurzuur
B. 616 m.gr. „ ,
gemiddeld dus 616 m.gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 422 m.gr. benzoëzuur.

Wij vinden dus hier een surplus aan benzoëzuur van 61 m.gr.

Recapituleerend vinden wij:

	tot hoev. benz.z.	tot hoev. hipp. z.
1e 8 uur...	11,646 gr. benz.z.;	15,624 gr. hipp.z. (= 10,648 gr. benz.z.)
2e 8 „ ...	0,369 „ „ ;	0,419 „ „ (= 0,286 „ „)
3e 8 „ ...	0,483 „ „ ;	0,616 „ „ (= 0,422 „ „)
In 24 uur...	12,498 gr. benz.z.;	16,659 gr. hipp.z. (= 11,356 gr. benz.z.)

Patiënt heeft 15 gr. benzoas natricus gebruikt, waarvan wij terugvinden 12,498 gr. — 0,515 gr. (Voordag) = 11,983 gr. benzoëzuur, d.i. 94½ %.

Ofschoon wij reeds vroeger gezien hebben, dat er slechts een te verwaarloozen hoeveelheid ongebonden benzoëzuur in de urine voorkomt, hebben wij voor alle zekerheid nog eens bij al de volgende proeven de urine onderzocht op ongebonden benzoëzuur, om aldus zeker te zijn, dat geen hippuurzuur gesplitst wordt. Hieronder volgen de protocollen.

PROEF IV.

21. 1. 1923.

VOORDAG.

De urine van patiënt Z wordt gedurende 24 uur opgevangen en wel in 5 cc. salpeterzuur.

Hoeveelheid urine 1965 cc., waarbij 5 cc. HNO_3; s.g. 1018; reactie: zuur (er is salpeterzuur toegevoegd); eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 50 cc. urine zijn noodig ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.

In 50 cc. urine zijn dus slechts aanwezig 2,47 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 3,25 cc. Na-aethylaat 0,09415 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 3,20 cc. Na-aethylaat 0,09415 N.

In 1960 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 1,452 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 1960 cc. urine zijn aanwezig .... A. 2,630 gr. hippuurzuur
B. 2,520 gr. „ ,
gemiddeld dus 2,575 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 1,754 gr. benzoëzuur.

PROEFDAG.

22. 1. 1923.

Patiënt V. gebruikt 6 / 2½ gr. benzoas natricus in capsules en wel binnen een half uur; geen klachten.

Gemengd diëet.

De urine wordt gedurende 24 uur opgevangen en wel gedurende 9 uur, 7 uur en 8 uur.

1e 9 uur.

Hoeveelheid urine 1150 cc.; s.g. 1017; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Positief (typische reactie).
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine ..	„ zwarte band 500—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 50 cc. urine zijn noodig ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.

In 50 cc. urine zijn dus slechts 2,47 m.gr. vrij benzoëzuur aanwezig.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc. urine zijn noodig .. 21,95 cc. Na-aethylaat 0,08963 N.
Voor 25 cc. urine (contrôle) .. 22,00 cc. Na-aethylaat 0,08963 N.

In 1150 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 11,037 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 1150 cc. urine zijn aanwezig A. 14,430 gr. hippuurzuur
B. 14,290 gr. „ ,
gemiddeld dus 14,360 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 9,787 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte in de urine wordt dus 1250 m.gr. benzoëzuur meer gevonden dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

11,3 % van het uitgescheiden benzoëzuur is dus niet aan het glycocoll gebonden.

2e gedeelte van den Proefdag (= 7 uur).

Hoeveelheid urine 362,5 cc.; s.g. 1022; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Zwak Positief (Groengeel).
	Nylander	Negatief.
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine ..	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 50 cc. urine zijn noodig..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.

In 50 cc. urine zijn dus slechts 2,47 m.gr. benzoëzuur aanwezig.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig .. 19,80 cc. Na-aethylaat 0,0923 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) .. 19.65 cc. Na-aethylaat 0,0923 N.

In 362,5 cc. urine zijn dus gemiddeld aanwezig 1,611 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 362,5 cc. urine zijn aanwezig .... A. 2,388 gr. hippuurzuur
B. 2,324 gr. „ ,
gemiddeld dus 2,356 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 1,606 gr. benzoëzuur.

Wij vinden dus een surplus van slechts 5 m.gr. benzoëzuur.

3e 8 uur.

Hoeveelheid urine 312,5 cc.; s.g. 1018; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 50 cc. urine zijn noodig .... 0,08 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,08 cc. NaOH 0,2025 N.

Wij vinden dus gemiddeld *2* m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig .. 4,65 cc. Na-aethylaat 0,0923 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) .. 4,65 cc. Na-aethylaat 0,0923 N.

In 312,5 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig *325* m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 312,5 cc. urine zijn aanwezig .... A. 480 m.gr. hippuurzuur
B. 476 m.gr. „ „
gemiddeld dus 478 m.gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 326 m.gr. benzoëzuur.

Recapituleerende vinden wij:

	tot. hoev. benz.z.	tot. hoev. hipp.z.	
1e 9 uur...	11,037 gr. benz.z.;	14,360 gr. hipp.z.	(= 9,787 gr. benz.z.)
2e 7 „ ...	1,611 „ „ ;	2,356 „ „	(= 1,606 „ „)
3e 8 „ ...	0,326 „ „ ;	0,478 „ „	(= 0,326 „ „)
In 24 uur...	12,974 gr. benz.z.;	17,194 gr. hipp.z.	(= 11,719 gr. benz.z.)

Patiënt heeft 15 gr. benzoas natricus gebruikt; hiervan wordt teruggevonden 12,974 gr. — 1,826 gr. (Voordag) = 11,148 gr. benzoëzuur, d.i. ongeveer 90 %.

PROEF V.

29. 1. 1923.

Voordag.

Van patiënt W. wordt de urine gedurende *24* uur in 5 cc. salpeterzuur opgevangen.

Hoeveelheid urine 2065 cc., waarbij 5 cc. geconcentreerd salpeterzuur, s.g. 1014; reactie: zuur (salpeterzuur!); eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 50 cc. urine zijn noodig ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.

In 50 cc. urine zijn dus aanwezig 2,47 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig .. 2,35 cc. Na-aethylaat 0,0959 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) .. 2,35 cc. Na-aethylaat 0,0959 N.

In 2060 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 1,136 gr. benbenzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 2060 cc. urine zijn aanwezig.... A. 1,753 gr. hippuurzuur,
B. 1,685 gr. „ ,
gemiddeld dus 1,719 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 1,171 gr. benzoëzuur.

Proefdag.

30. 1. 1923.

Patiënt P. heeft 6 × 2,5 gr. benzoas natricus (in capsules) binnen een half uur gebruikt; geen klachten. Gemengd diëet.

De urine wordt gedurende 3 × 8 uur opgevangen.

Urine van de 1e 8 uur.

Hoeveelheid urine 1230 cc.; s.g. 1016; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Positief (typische reactie).
	Nylander	„
Glucuronz-reacties	Naphtoresorcine ..	„ zwarte band 525—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 50 cc. urine zijn noodig ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.

In 50 cc. urine zijn slechts 2,47 m.gr. benzoëzuur aanwezig.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc. urine zijn noodig 18,45 cc. Na-aethylaat 0,09686 N.
Voor 25 cc. urine (contrôle) 18,55 cc. Na-aethylaat 0,09686 N.

In 1230 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 10.750 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 1230 cc. urine zijn aanwezig A. 14.750 gr. hippuurzuur
B. 14,450 gr. „ ,
gemiddeld dus 14,6 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 9,951 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte in de urine wordt dus 799 m.gr. benzoëzuur meer gevonden dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

7,9 % van het uitgescheiden benzoëzuur is dus niet aan glycocoll gebonden.

Urine van de 2e 8 uur:

Hoeveelheid urine 375 cc.; s.g. 1024; reactie: zuur; eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief onderzoek.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 50 cc. urine zijn noodig ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.

In 50 cc. urine zijn dus slechts 2,47 m.gr. benzoëzuur aanwezig.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig.... 5,4 cc. Na-aethylaat 0,0959 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) .... 5,45 cc. Na-aethylaat 0,0959 N.

In 375 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 477 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 375 cc. urine zijn aanwezig.... A. 702 m.gr. hippuurzuur
B. 684 m.gr. „ ,
gemiddeld dus 693 m.gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 472 m.gr. benzoëzuur.

Urine van de 3e 8 uur.

Hoeveelheid urine 730 cc.; s.g. 1011; reactie: zuur; eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur. (Wiechowski)

Voor 50 cc. urine zijn noodig ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.

In 50 cc. urine zijn dus slechts 2,47 m.gr. benzoëzuur aanwezig.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 2,25 cc. Na-aethylaat 0,0959 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 2,25 cc. Na-aethylaat 0,0959 N.

In 730 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 387 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 730 cc. urine zijn aanwezig.... A. 539 m.gr. hippuurzuur
B. 519 m.gr. „ ,
gemiddeld dus 529 m.gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 360 m.gr. benzoëzuur.

Recapituleerende vinden wij:

	tot. hoev. benz.z.	tot. hoev. hipp.z.	
1e 8 uur...	10,750 gr. benz.z.;	14,600 gr. hipp.z.	(= 9,951 gr. benz.z.)
2e 8 „ ...	0,477 „ „ ;	0,693 „ „	(= 0,472 „ „)
3e 8 „ ...	0,387 „ „ ;	0,529 „ „	(= 0,360 „ „)
In 24 uur...	11,614 gr. benz.z.;	15,822 gr. hipp.z.	(= 10,783 gr. benz.z.)

Van de 15 gr. benzoas natricus, die toegediend zijn, vinden wij terug 11,614 gr. — 1,136 gr. (Voordag) = 10,478 gr. benzoëzuur, d.i. 83 %.

PROEF VI.

6. 2. 1923.

Voordag.

Van patiënt Q. is de urine gedurende 24 uur met 5 cc. geconcentreerd salpeterzuur opgevangen.

Hoeveelheid urine 1600 cc.; s.g. 1027; reactie: zuur (HNO_3!); eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 50 cc. urine zijn noodig .... 0,08 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,08 cc. NaOH 0,2025 N.

In 50 cc. urine vinden wij dus 2,00 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 3,95 cc. Na-aethylaat 0,094 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 3,95 cc. Na-aethylaat 0,094 N.

In 1600 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 1,450 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 1600 cc. urine zijn aanwezig.... A. 2,344 gr. hippuurzuur
B. 2,404 gr. „ ,
gemiddeld dus 2,374 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 1,618 gr. benzoëzuur.

PROEFDAG.

7. 2. 1923.

Patiënt gebruikt 6 × 2,5 gr. benzoas natricus (in capsules); geen klachten. Gemengd diëet.

De urine van de 1e 8 uur.

Hoeveelheid urine 700 cc.; s.g. 1022; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Positief (typische reactie).
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine ..	„ zwarte band 500—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 50 cc. urine zijn noodig .... 0,08 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,08 cc. NaOH 0,2025 N.

In 50 cc. urine zijn dus slechts 2,00 m.gr. benzoëzuur aanwezig.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc. urine zijn noodig 18,65 cc. Na-aethylaat 0,09625 N.
Voor 25 cc. urine (contrôle) 18,85 cc. Na-aethylaat 0,09625 N.

In 700 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 6,166 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 700 cc. urine zijn aanwezig.... A. 8,303 gr. hippuurzuur
B. 8,355 gr. „ „
gemiddeld dus 8,329 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 5,677 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte wordt dus 489 m.gr. benzoëzuur meer gevonden dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

Wij zien, dat in de eerste 8 uur slechts ongeveer de helft van de toegediende dosis benzoas natricus als benzoëzuur resp. hippuurzuur uitgescheiden is, zoodat wij in de 2e 8 uur de ontbrekende hoeveelheden mogen verwachten, hetgeen inderdaad het geval blijkt te zijn.

Urine van de 2e 8 uur.

Hoeveelheid urine 540 cc.; s.g. 1026; reactie: zuur; eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling	Positief (typische reactie).
	Nylander	„
	Naphtoresorcine ..	„ zwarte band 570—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 50 cc. urine zijn noodig .... 0,07 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,1 cc. NaOH 0,2025 N.

In 50 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 2,00 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc. urine zijn noodig 22,80 cc. Na-aethylaat 0,09625 N.
Voor 25 cc. urine (contrôle) 22,65 cc. Na-aethylaat 0,09625 N.

In 540 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 5,764 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 540 cc. urine zijn aanwezig.... A. 7,741 gr. hippuurzuur
B. 7,858 gr. „ ,
gemiddeld dus 7,8 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 5,317 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte worden dus 447 m.gr. benzoëzuur meer gevonden, dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

8 % van het uitgescheiden benzoëzuur is dus niet aan glycocoll gebonden.

Het blijkt, dat de uitscheiding van het hippuurzuur en de andere benzoëzuur-verbinding bij dezen patiënt zeer langzaam geschiedt, terwijl men verder ziet, dat de uitscheiding van het hippuurzuur en die van de benzoëzuur-verbinding parallel aan elkaar verloopen.

Urine van de 3e 8 uur.

Hoeveelheid urine 370 cc.; s.g. 1027; reactie: zuur; eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Voor 50 cc. urine zijn noodig .... 0,05 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) ..... 0,05 cc. NaOH 0,2025 N.

In 50 cc. urine zijn dus slechts 1,23 m.gr. benzoëzuur aanwezig.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc. urine zijn noodig 3,05 cc. Na-aethylaat 0,0945 N.
Voor 25 cc. urine (contrôle) 3,15 cc. Na-aethylaat 0,0945 N.

In 370 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 533 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 370 cc. urine zijn aanwezig.... A. 776 m.gr. hippuurzuur
B. 806 m.gr. „ ,
gemiddeld dus 791 m.gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 537 m.gr. benzoëzuur.

Recapituleerende vinden wij:

	tot. hoev. benz.z.	tot. hoev. hipp.z.	
1e 8 uur...	6,166 gr. benz.z.;	8,329 gr. hipp.z.	(= 5,677 gr. benz.z.)
2e 8 „ ...	5,764 „ „ ;	7,800 „ „	(= 5,317 „ „)
3e 8 „ ...	0,533 „ „ ;	0,791 „ „	(= 0,537 „ „)
In 24 uur...	12,463 gr. benz.z.;	16,920 gr. hipp.z.	(= 11,531 gr. benz.z.)

Van de 15 gr. benzoas natricus, die toegediend zijn, vinden wij terug 12,463 gr. — 1,541 gr. (Voordag) = 10,922 gr. benzoëzuur, d.i. 86 %.

Wanneer wij de waarde van de totale hoeveelheid benzoëzuur vergelijken met de waarde van het benzoëzuur, dat wij uit de hoeveelheid hippuurzuur kunnen berekenen, komen wij tot het volgende resultaat:

In de urine van den Proefdag (1e 8 uur) vinden wij steeds een surplus aan benzoëzuur, dat niet aan glycocoll, maar aan andere stoffen gepaard is.

De quantitatieve proeven met de natieve urine van de 1e 8 uur van den Proefdag loopen parallel met de qualitatieve proeven, t.w. overal waar een surplus aan benzoëzuur in de urine aanwezig is, zijn de reacties met Fehling, Nylander, Naphtoresorcine, Orcine en Phloroglucine positief. Het is dus waarschijnlijk, dat een gedeelte van het uitgescheiden benzoëzuur aan glucuronzuur gepaard is. (7—11,5 %)

Bij de voorafgaande proeven hebben wij dus de hoeveelheid benzoëzuur van het hippuurzuur vergeleken met de totale hoeveelheid benzoëzuur.

HOOFDSTUK VI.

De gemodificeerde methode van Kingsbury-Swanson.

Door de voorafgaande proeven hebben wij getracht aan te toonen, dat na het gebruik van 15 gr. benzoas natricus in de urine van den mensch (1e 8 uur) een hoeveelheid benzoëzuur behalve aan glycocoll ook aan andere stoffen, speciaal glucuronzuur, gepaard is. Desnoods zou men nog de volgende tegenwerping kunnen maken.

Bij de methode van Kingsbury-Swanson gaat men uit van *de urine als zoodanig* en bepaalt in deze urine de hoeveelheid benzoëzuur; daarentegen bepaalt men met de methode van Snapper-Laqueur *niet* in de urine, maar *in den aethylacetaat,* waarmee men de aangezuurde urine uitgeschud heeft, de hoeveelheid hippuurzuur.

Men zou kunnen vragen of, wanneer groote hoeveelheden hippuurzuur aanwezig zijn, zooals bij onze proeven het geval is, deze dan geheel in den aethylacetaat overgaan. Misschien zou bij het uitschudden een gedeelte van het hippuurzuur in de urine achterblijven. Bij de bepaling van het hippuurzuur zou men dan in den aethylacetaat te kleine waarden verkrijgen voor de hoeveelheid benzoëzuur, die aan glycocoll gebonden is en hierdoor bij vergelijking van de waarden, die voor de totale hoeveelheid benzoëzuur verkregen worden, een surplus vinden.

Wanneer dit het geval zoude zijn, dan zou dus het gevonden surplus voor een zeker deel berusten op een fout in onze proeven.

Deze tegenwerping is onjuist. Immers in Hoofdstuk IV hebben wij aangetoond, dat hippuurzuur, hetwelk aan de urine is toegevoegd, zoowel met de methode van Kingsbury-Swanson, als met de methode van Snapper-Laqueur quantitatief wordt aangetoond. Bij het uitschudden met aethylacetaat, gelijk dit bij de methode van Snapper-Laqueur geschiedt, blijft dus geen hippuurzuur in de urine achter.

Desondanks hebben wij misschien uit overmaat van voorzichtigheid, de proeven van de vorige hoofdstukken volgens Kingsbury-Swanson bepaald in den aethylacetaat, waarmede de urine 6 maal uitgeschud was.

Zooals bekend is, lossen èn het hippuurzuur èn het benzoëzuur alsmede het benzoëglucuronzuur zeer gemakkelijk op in aethylacetaat.

Wij begonnen daarom de proef als volgt:

50 cc. urine worden aangezuurd met HCl, geschud met 6 × 50 cc. aethylacetaat en daarna wordt de aethylacetaat afgedestilleerd.

Hippuurzuur is een betrekkelijk bestendige stof, die de temperatuur van het afdestilleeren zonder splitsing kan verdragen; het was echter de vraag of eventueel vrij benzoëzuur bij deze destillatie niet zou wegsublimeeren. Bovendien zijn de verbindingen van benzoëzuur en glucuronzuur onbestendig en worden reeds bij 40° gesplitst. Bij de destillatie zou dus het benzoëglucuronzuur door splitsing en sublimeeren kunnen verdwijnen. Om deze moeilijke klip te omzeilen hebben wij bij het afdestilleeren van den aethylacetaat den voorzorgsmaatregel genomen, van te voren aan den aethylacetaat loog toe te voegen en tevens een indicator, om te zien of de hoeveelheid loog

voldoende was, om al het aanwezige zuur te neutraliseeren. Benzoas natricus verdwijnt n.l. niet door sublimatie.

Als indicator gebruikten wij het Phenolphtaleine.

De methode, die wij de gemodificeerde methode van Kingsbury-Swanson zullen noemen, komt op het volgende neer.

2 × 100 cc. urine worden met HCl zuur gemaakt, vervolgens ieder der beide porties met 6 × 100 cc. aethylacetaat geschud, waarna de totale hoeveelheid aethylacetaat in twee gelijke deelen verdeeld wordt.

Aan de eerste helft aethylacetaat wordt nu voldoende loog toegevoegd (7,5 cc. NaOH van 33½ %) om een sterke alkalische reactie te verkrijgen en daarna destilleert men af. Het residu wordt opgelost in 50 cc. water, 500 m.gr. MgO en 5 gr. NaOH toegevoegd, waarna men de vloeistof een kwart tot een half uur kookt. Daarna pipetteert men 1 cc. 7 % $KMnO_4$ in de kolf, kookt nog eens gedurende 1 minuut en koelt af. Vervolgens giet men voorzichtig 30 cc. geconcentreerd salpeterzuur bij en kookt het geheel gedurende 45 minuten boven een kleine vlam aan een opstijgenden koeler.

Na afloop van deze manupulatie worden de koeler en de kurk beide met warm water (25 cc.) nagespoeld.

Men kan thans deze vloeistof niet dadelijk met chloroform uitschudden en met Na-aethylaat titreeren. Immers bij het afdestilleeren van den aethylacetaat is azijnzuur vrijgekomen. Deze wordt noch door koken met loog, noch door koken met salpeterzuur vernietigd. Wanneer men dus met chloroform zou uitschudden, zou hierin zoowel benzoëzuur als azijnzuur overgaan. Bij titratie zou men dus veel te hooge waarden verkrijgen.

Het azijnzuur moet derhalve verwijderd worden. Wij hebben hiertoe de vloeistof na koken uitgeschud met petroleumaether: hierin lost n.l. benzoëzuur wel, doch azijnzuur niet op.

Na het koken met HNO_3 wordt de vloeistof dus met 10 × 50 cc. petroleumaether geschud. De petroleumaether wordt gefiltreerd, het filter nagespoeld met verschen petroleumaether, waarna men het filtraat met 4 × 25 cc. NaOH van 10 % schudt, zoodat alle benzoëzuur in de waterige oplossing overgaat. De 100 cc. alkalische oplossing moet nog even gekookt worden, om eventueel meegesleepten petroleumaether te verwijderen. Na afkoeling maakt men de oplossing sterk zuur met geconcentreerd salpeterzuur, waarna men de oplossing met chloroform schudt volgens de methode van Folin en Flanders en vervolgens met Na-aethylaat titreert.

De andere helft van de 600 cc. aethylacetaat behandelt men geheel volgens de methode van Snapper-Laqueur, t.w. eerst wasschen met ¼ volume verzadigde zoutsolutie, daarna afdestilleeren etc.

Hieronder volgen eenige protocollen, waaruit men ziet, dat met de gemodificeerde methode van Kingsbury-Swanson het azijnzuur van den aethylacetaat werkelijk geëlimineerd wordt.

PROEF I.

100 cc. gedestilleerd water worden met 100 cc. aethylacetaat in een scheitrechter gegoten en flink geschud. Nadat de vloeistoffen zich afgescheiden hebben, laat men het water in een Kjeldahlkolf afloopen en behandelt dit volgens de methode van Kingsbury-Swanson met *tus-*

schenschakeling van petroleumaether. (Zie Methodiek)

Bij titratie blijkt, dat wij 0,4 cc. Na-aethylaat van 0,09 N. noodig hebben, hetgeen overeenkomt met 4,4 m.gr. benzoëzuur.

PROEF II.

Dezelfde proef als hierboven *zonder tusschenschakeling van petroleumaether.* Bij titratie blijkt nu meer dan 25 cc. Na-aethylaat noodig te zijn, m.a.w. de *tusschenschakeling van petroleumaether is dus absoluut noodig om het azijnzuur van den aethylacetaat te verwijderen, daar dit zuur in de chloroform oplost en dus bij titratie grove fouten ontstaan.*

PROEF III.

50 cc. zuurgemaakte urine worden tot zesmaal toe uitgeschud met 50 cc. aethylacetaat en daarna wordt deze uitgeschudde, doch met aethylacetaat verzadigde urine behandeld volgens de methode van Kingsbury-Swanson. *met tusschenschakeling van petroleumaether* en bovendien volgens de methode van Snapper-Laqueur.

Bij titratie blijkt, dat wij 0,6 cc. Na-aethylaat 0,09 N. noodig hebben, hetgeen overeenkomt met 6,6 m.gr. benzoëzuur.

Volgens de methode van Snapper-Laqueur zijn in 50 cc. van dezelfde urine 8,5 m.gr. hippuurzuur aanwezig, d. i. 6 m.gr. benzoëzuur.

PROEF IV.

De 6 × 50 cc. aethylacetaat van proef III worden met 80 cc. gedestilleerd water gewasschen en dit waschwater

wordt behandeld volgens de methode van Kingsbury-Swanson *met tusschenschakeling van petroleumaether.* Er blijkt bij titratie 0,4 cc. Na-aethylaat 0,09 N. noodig te zijn, hetgeen overeenkomt met 4,4 m.gr. benzoëzuur.

Uit de protocollen blijkt, dat met de gecombineerde methoden van Snapper-Laqueur en Kingsbury-Swanson bevredigende resultaten worden verkregen, mits men een constante fout aanneemt, overeenkomende met 0,4 cc. Na-aethylaat 0,09 N., welke men van de verkregen titratie-waarden moet aftrekken.

Wij moeten nu nog bewijzen, dat de gemodificeerde methode van Kingsbury-Swanson gebruikt kan worden, wanneer men voor de titratie-waarden de constante fout van 0,4 cc. Na-aethylaat 0,09 N. aftrekt.

PROEF I.

Bij 200 m.gr. hippuurzuur, die in 50 cc. gedestilleerd water opgelost zijn, voegt men 0,5 cc. HCl van 38 %, waarna de oplossing met 6 × 50 cc. aethylacetaat flink geschud wordt.

De 300 cc. aethylacetaat worden, nadat 7½ cc. NaOH van 33⅓ % toegevoegd zijn, afgedestilleerd en bij het residu voegt men alsdan 5 gr. NaOH anhydricum en 500 m.gr. MgO. Het mengsel wordt in 50 cc. gedestilleerd water opgelost en verder behandeld volgens de methode van Kingsbury-Swanson, met tusschenschakeling van petroleumaether. Bij titratie vindt men (na aftrek van de constante fout van 0,4 cc. Na-aethylaat 0,09 N.), dat 11,95 cc. Na-aethylaat van 0,0925 N. noodig zijn, hetgeen overeenkomt met 135 m.gr. benzoëzuur, d.i. 198 m.gr. hippuurzuur. Er is dus verloren gegaan 2 m.gr. of wel 1 %.

PROEF II.

Van 200 m.gr. hippuurzuur vinden wij met de gemodificeerde methode van Kingsbury-Swanson 199 m.gr. hippuurzuur terug.

Er is dus verloren gegaan 1 m.gr. of wel ½ %.

PROEF III.

Van 200 m.gr. hippuurzuur vinden wij met dezelfde methode 198 m.gr. hippuurzuur terug.

Er is dus verloren gegaan 2 m.gr. of wel 1 %.

Uit bovenstaande proeven blijkt, dat men met de gemodificeerde methode van Kingsbury-Swanson bij waterige benzoëzuuroplossingen bevredigende resultaten verkrijgt. De volgende proeven worden verricht met normale urine met en zonder toevoeging van hippuurzuur.

PROEF IV.

50 cc. urine worden zuur gemaakt met HCl van 38 % en alsdan met 6 × 50 cc. aethylacetaat uitgeschud. Vervolgens destilleert men af (onder toevoeging van voldoende loog) en behandelt het residu, dat in 50 cc. gedestilleerd water opgelost wordt, volgens de gemodificeerde methode van Kingsbury-Swanson, met tusschenschakeling van petroleumaether. (zie Methodiek)

Bij titratie vindt men, dat 0,60 cc. Na-aethylaat van 0,094 N. noodig zijn. (na aftrek van de constante fout)

Voor de contrôle-proef bleek noodig te zijn 0,60 cc. Na-aethylaat.

In 50 cc. urine zijn dus gemiddeld aanwezig 6,9 m.gr. benzoëzuur.

Volgens de methode van Snapper-Laqueur zijn in 50 cc.

van dezelfde urine 9,5 m.gr. hippuurzuur aanwezig, hetgeen overeenkomt met 6,5 m.gr. benzoëzuur.

PROEF V.

Bij 50 cc. urine (dezelfde als proef IV) voegt men 200 m.gr. hippuurzuur en ½ cc. HCl van 38 % en behandelt de oplossing volgens de gemodificeerde methode van Kingsbury-Swanson.

Bij titratie vinden wij, dat 12,45 cc. Na-aethylaat van 0,094 N. noodig zijn.

In 50 cc. urine zijn dus aanwezig 143 m.gr. benzoëzuur.

In 50 cc. urine zonder toevoeging van hippuurzuur waren 6,9 m.gr. benzoëzuur aanwezig. Wij vinden van de 200 m.gr. hippuurzuur 143 m.gr. — 6,9 m.gr. = 136,1 m.gr. benzoëzuur terug, hetgeen overeenkomt met 199,5 m.gr. hippuurzuur.

Er is dus verloren gegaan 0,5 m.gr. hippuurzuur of wel 0,25 %.

Bovengenoemde proeven werden nog driemaal herhaald met hetzelfde resultaat.

Uit bovenstaande proeven blijkt dus, dat met de gemodificeerde methode van Kingsbury-Swanson bevredigende resultaten worden verkregen, indien men een constante fout van 0,4 cc. Na-aethylaat van 0,094 N. van de verkregen titratie-waarden aftrekt.

Thans volgens de protocollen der proeven, waarin de urine na het toedienen van 15 gr. benzoas natricus onderzocht werd:

1. op totaal benzoëzuur-gehalte volgens de *gemodificeerde* methode van Kingsbury-Swanson;
2. op hippuurzuur volgens de methode van Snapper-Laqueur.

PROEF I.

Voordag.

24. 7. 1922.

Van patiënt X. wordt de urine gedurende 24 uur opgevangen.

Hoeveelheid urine 1580 cc.; s.g. 1024; reactie: zuur; eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (gemodif. Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 2,6 cc. Na-aethylaat 0.094 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 2,65 cc. Na-aethylaat 0.094 N.

In 1580 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 948 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 1580 cc. urine zijn aanwezig .... A. 1,398 gr. hippuurzuur
B. 1,366 gr. „ ,
gemiddeld dus 1,382 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 942 m.gr. benzoëzuur.

PROEFDAG.

25. 7. 1922.

Patiënt gebruikt 10 gr. benzoas natricus. Daar deze stof al spoedig klachten van misselijkheid en braken geeft, hebben wij het benzoas natricus als volgt toegediend:

R.

Benzoas natricus	gr.	10
Tinctura aurantiorum	„	5
Aqua depurata	„	35

S. in drieën te nemen binnen 20 minuten.

Ik heb dit recept herhaaldelijk zelf ingenomen en geconstateerd, dat het mengsel goed verdragen wordt en de klachten niet noemenswaard zijn.

Op verschillende uren van den dag worden de diverse qualiteiten van de urine onderzocht.

1e 2 uur.

Hoeveelheid urine 250 cc.; s.g. 1032; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

2e 2 uur.

Hoeveelheid urine 100 cc.; s.g. 1032; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Een langzaam opkomende, zeer sterk positief wordende reactie (geelbruin van kleur)
	Nylander	Positief.
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine..	„ (donker violette kleur) zwarte band 550—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

Na 7 uur vanaf het begin der proef.

	Fehling.....	Positief.
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine ..	„ zwarte band 550—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

De morgen-urine, 18 uur na het begin der proef.

Glucuronz.-reacties.	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
	Naphtoresorcine	„
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

De hoeveelheid urine, die gedurende 24 uur opgevangen is, bedraagt 1525 cc.

Quantitatief Onderzoek van de 24 uurs urine van den Proefdag.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (gemodif. Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 21,5 cc. Na-aethylaat 0,093 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 21,4 cc. Na-aethylaat 0.093 N.

In 1525 cc. urine zijn gemiddeld 7,430 gr. benzoëzuur aanwezig.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 1525 cc. urine zijn aanwezig.. A. 10,157 gr. hippuurzuur
B. 10,043 gr. „ ,
gemiddeld dus 10.1 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 6,88 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte in de urine wordt dus 7,430 gr. — 6,880 gr. = 0,550 gr. benzoëzuur meer gevonden dan overeenkomt met het benzoëzuurgehalte van het aanwezige hippuurzuur.

7,5 % van het uitgescheiden benzoëzuur is dus niet aan glycocoll gebonden.

Van de 10 gr. benzoas natricus zijn dus teruggevonden 7,430 gr. — 0,948 gr. (Voordag) = 6,482 gr. benzoëzuur of wel 77 %.

PROEF II.

14. 9. 1922.

VOORDAG.

Van patiënt Y. wordt de urine gedurende 12 uur opgevangen.

Hoeveelheid urine 1568 cc.; s.g. 1016; reactie: zwak zuur; eiwit: negatief.

	Fehling.....	Positief (patiënt blijkt achteraf erythroltetranitraat gebruikt te hebben).
Glucuronz.-reacties.	Nylander	„
	Naphtoresorcine ..	Negatief.
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (gemodif. Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 0,9 cc. Na-aethylaat 0,1 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 0,9 cc. Na-aethylaat 0,1 N.

In 1568 cc. urine zijn aanwezig 345 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 1568 cc. urine zijn aanwezig.. A. 505 m.gr. hippuurzuur,
B. 501 m.gr. „ ,
gemiddeld dus 503 m.gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 342 m.gr. benzoëzuur.

PROEFDAG.

15. 9. 1922.

Patiënt krijgt 10 gr. benzoas natricus, hetgeen goed verdragen wordt. Iedere drie uur vangt men de urine op en wel gedurende 12 uur.

Urine van de eerste 3 uur.

Hoeveelheid urine 620 cc.; s.g. 1011; reactie: zuur; eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling.....	Positief (Zie Voordag).
	Nylander	„ „ „
	Naphtoresorcine ..	„ zwarte band 550—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

Urine van de tweede 3 uur.

Hoeveelheid urine 345 cc.; s.g. 1012; reactie: zuur; eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling.....	Positief (Zie Voordag).
	Nylander	„ „ „
	Naphtoresorcine ..	„ donker violet zwarte band 550—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

Urine van de derde 3 uur.

Hoeveelheid urine 150 cc.; s.g. 1012; reactie: zuur; eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling.....	Positief (Zie Voordag).
	Nylander	„ „ „
	Naphtoresorcine ..	Negatief bruinroode kleur, wazige grijze band in het geel
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Urine van de vierde 3 uur.

Hoeveelheid urine 406 cc.; s.g. 1012; reactie: zuur; eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling.....	Positief (Zie Voordag).
	Nylander	„ „ „
	Naphtoresorcine ..	Negatief.
	Orcine	„
	Phloroglucine	„

Quantitatief Onderzoek.

1e 3 uur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (gemodif. Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 21,75 cc. Na-aethylaat 0,1164 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 22,0 cc. Na-aethylaat 0,1164 N.

In 620 cc. urine zijn dus gemiddeld aanwezig 3,8564 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 620 cc. urine zijn aanwezig.... A. 5,062 gr. hippuurzuur
B. 5,002 gr. „ ,
gemiddeld dus 5,032 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 3,429 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte in de urine wordt dus 428 m.gr. benzoëzuur meer gevonden dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

11½ % van het uitgescheiden benzoëzuur is dus niet aan glycocoll gebonden.

2e 3 uur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (gemodif. Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 36,00 cc. Na-aethylaat 0,1164 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 35,80 cc. Na-aethylaat 0,1164 N.

In 345 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 3,5155 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 345 cc. urine zijn aanwezig.... A. 4,721 gr. hippuurzuur
B. 4,725 gr. „ ,
gemiddeld dus 4,723 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 3,2195 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte in de urine wordt dus 296 m.gr. benzoëzuur meer gevonden dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

8½ % van het uitgescheiden benzoëzuur is dus niet aan glycocoll gebonden.

3e 3 uur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (gemodif. Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc. urine zijn noodig 6,05 cc. Na-aethylaat 0,0972 N.
Voor 25 cc. urine (contrôle) 5,85 cc. Na-aethylaat 0,0972 N.

In 150 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 0,423 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 150 cc. urine zijn aanwezig.... A. 0,447 gr. hippuurzuur
B. 0,447 gr. „ ,
gemiddeld dus 0,447 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 0,305 gr. benzoëzuur.

We vinden hier een surplus van 118 m.gr. benzoëzuur.

4e 3 uur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (gemodif. Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 4,65 cc. Na-aethylaat 0,0972 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 4,60 cc. Na-aethylaat 0,0972 N.

In 406 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 444 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 406 cc. urine zijn aanwezig.... A. 420 m.gr. hippuurzuur
B. 410 m.gr. „ ,
gemiddeld dus 415 m.gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 283 m.gr. benzoëzuur.

Recapituleerende vinden wij dus:

	tot. hoev. benz.z.	tot. hoev. hipp.z.	
1e 3 uur...	3,8564 gr. benz.z.;	5,032 gr. hipp.z.	(= 3,424 gr. benz.z.)
2e 3 „ ...	3,5155 „ „ ;	4,724 „ „	(= 3,220 „ „)
3e 3 „ ...	0,423 „ „ ;	0,447 „ „	(= 0,305 „ „)
4e 3 „ ...	0,444 „ „ ;	0,415 „ „	(= 0,283 „ „)
1e 12 uur...	8,239 gr. benz.z.;	10,618 gr. hipp.z.	(= 7,232 gr. benz.z.)

Wij krijgen dus in de eerste 12 uur 1,007 gr. benzoëzuur, dat niet aan glycocoll gepaard is; d.i. 12,2 %.

Van de 10 gr. benzoas natricus, die de patiënt gebruikt, vindt men 8,239 gr. benzoëzuur in de eerste 12 uur terug.

In de urine van de eerste 12 uur van den voordag zijn 345 m.gr. benzoëzuur aanwezig, zoodat in werkelijkheid teruggevonden wordt 8,239 gr. — 0,345 gr. = 7,894 gr. benzoëzuur of wel 93 %.

PROEF III.

25. 9. 1922.

Voordag.

Patiënt gebruikt een diëet, dat geen benzoëzuur of hippuurzuur bevat.

De urine wordt gedurende 24 uur opgevangen.

Hoeveelheid urine 2016 cc.; s.g. 1012; reactie: zuur; eiwit: negatief.

Glucuronz.-reacties.	Fehling	Negatief.	
	Nylander	„	
	Naphtoresorcine	„	, wazige band
	Orcine	„	
	Phloroglucine	„	

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (gemodif. Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 1,55 cc. Na-aethylaat 0,0979 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 1,50 cc. Na-aethylaat 0,0979 N.

In 2016 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 734 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 2016 cc. urine zijn aanwezig A. 1040 m.gr. hippuurzuur
B. 1056 m.gr. „ ,
gemiddeld dus 1048 m.gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 714 m.gr. benzoëzuur.

PROEFDAG.

26. 9. 1922.

Patiënt (ikzelve) gebruikt hetzelfde diëet als op den vooidag en bovendien 10 gr. benzoas natricus.

Lichte intoxicatieverschijnselen worden waargenomen, zooals oorsuizen en misselijkheid, echter geen emesis of diarrhee; de verschijnselen duren ongeveer twee uur.

De urine wordt gedurende 2 maal 12 uur opgevangen.

1e 12 uur.

Hoeveelheid urine 1170 cc.; s.g. 1015; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling.....	Positief; een traag opkomende, langzaam zeer sterk wordende positieve reactie.
Glucuronz.-reacties.	Nylander	„
	Naphtoresorcine ..	„ zwarte band 550—600
	Orcine	„ streep bij 620
	Phloroglucine	„ streep tussch. D en E.

2e 12 uur.

Hoeveelheid urine 425 cc.; s.g. 1013; reactie: zuur; eiwit: negatief.

	Fehling	Negatief.
	Nylander	„
Glucuronz.-reacties.	Naphtoresorcine..	Zwak positief (violette kleur) zwarte streep in het geel
	Orcine	Zwak positief, onduidelijke streep bij 620
	Phloroglucine	Zwak positief, geen streep.

Quantitatief Onderzoek.

1e 12 uur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (gemodif. Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 28,3 cc. Na-aethylaat 0,098 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 28,4 cc. Na-aethylaat 0,098 N.

In 1170 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 7,933 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 1170 cc. urine zijn aanwezig A. 10,829 gr. hippuurzuur,
B. 10,815 gr. „ ,
gemiddeld dus 10,822 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 7,375 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte in de urine wordt dus 558 m.gr. benzoëzuur meer gevonden dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

7 % van het uitgescheiden benzoëzuur is dus niet aan glycocoll gebonden.

2e 12 uur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (gemodif. Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urine zijn noodig 2,65 cc. Na-aethylaat 0,098 N.
Voor 50 cc. urine (contrôle) 2,65 cc. Na-aethylaat 0,098 N.

In 425 cc. urine zijn gemiddeld aanwezig 265 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 425 cc. urine zijn aanwezig.... A. 369 m.gr. hippuurzuur
B. 361 m.gr. „ ,
gemiddeld dus 365 m.gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 248 m.gr. benzoëzuur.

In de urine van den proefdag worden dus in 24 uur uitgescheiden 8,198 gr. benzoëzuur, terwijl in den voordag 0,734 gr. benzoëzuur aanwezig zijn; er zijn dus van de 10 gr. toegediende benzoas natricus 7,464 gr. teruggevonden of wel 88 %.

Résumeerende zien wij, dat bij de proeven, waar de methode van Kingsbury-Swanson en Snapper-Laqueur gevolgd zijn, steeds een hoeveelheid benzoëzuur meer gevonden is bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

De qualitatieve proeven in de urine van den voordag zijn steeds negatief, terwijl er geen surplus aan benzoëzuur gevonden wordt. (Zie tabel I)

Uit deze resultaten van de gedeeltelijk gecombineerde methoden, waar wij zoowel de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson) als het benzoëzuur, dat aan glycocoll gepaard is (Snapper-Laqueur) beide bepaald in den aethylacetaat, waarmede de urine van den proefdag uitgeschud is, blijkt ons dus, dat hetzelfde surplus aan benzoëzuur gevonden wordt als bij de proeven met de oorspronkelijke methoden (blz. 51 enz.); m.a.w. *het hippuurzuur, dat in de urine aanwezig is, na toediening van een groote dosis benzoas natricus (10 tot 15 gr.), gaat in zijn geheel over in den aethylacetaat, wanneer men de urine van den proefdag voldoende met aethylacetaat heeft uitgeschud.* (Zie Methodiek)

TABEL I.

Uitscheiding van hippuurzuur en andere benzoëzuur-verbindingen in de menschelijke urine na toediening van 10 gram benzoas natricus.

DATUM	Toegediend	Proef		Uitscheiding van hippuurzuur en andere benzoëzuur-verbindingen. Totale hoeveelheid benzoëzuur bepaald met de gemodificeerde methode van Kingsbury-Swanson. Hippuurzuur bepaald met de methode van Snapper-Laqueur						OPMERKINGEN
				Totale hoeveelheid Benzoëzuur	Benzoëzuur als Hippuurzuur	Benzoëzuur niet aan Glycocoll	In % uitgedrukt	Glucuronzuur-Reacties		
24-7-1922.	10 gr.	I	Voord. 24 u.	0,948 gr.	0,942 gr.	—		—	—	
			Proefdag 24 uur	7,430 gr.	6,880 gr.	0,550 gr.	= 7,4%	+	+	+
14-9-1922.	10 gr.	II	Voord. 12 u.	0,345 gr.	0,342 gr.	—		—	—	—
			Proefdag 1e 3 uur	3,856 gr.	3,429 gr.	0,428 gr.	=12,2%	+	+	+
			2e 3 uur	3,5155 gr.	3,2195 gr.	0,296 gr.		+	+	+
			3e 3 uur	0,423 gr.	0,305 gr.	0,118 gr.		—	—	—
			4e 3 uur	0,444 gr.	0,283 gr.	0,161 gr.		—	—	—
25-9-1922.	10 gr.	III	Voordag	0,734 gr.	0,714 gr.	—		—	—	—
			Proefdag 1e 12 uur	7,933 gr.	7,375 gr.	0,558 gr.	= 7 %	+	+	+
			2e 12 uur	0,265 gr.	0,248 gr.	—		—	—	—

HOOFDSTUK VII.

Het benzoëglucuronzuur wordt in de urine door minerale zuren niet neergeslagen.

Aangezien het toegediende benzoëzuur voor 80—95 % als hippuurzuur in de urine voorkomt, kan het verschil tusschen de totale hoeveelheid benzoëzuur en het benzoëzuur van het hippuurzuur slechts enkele procenten bedragen. Het ligt voor de hand, dat men duidelijker en overzichtelijker resultaten verkrijgt, wanneer dit verschil grooter wordt. Hiertoe moet men trachten het hippuurzuur uit de urine te verwijderen zonder het benzoëzuur, dat aan andere stoffen gebonden is, te beïnvloeden.

Het is bekend, dat HNO_3 en H_2SO_4 het hippuurzuur neerslaan (Kobert)[4]. Wanneer wij nu aan de urine van den proefdag HNO_3 en H_2SO_4 toevoegen (2% van het volume) en deze eenigen tijd op een koele plaats laten staan, zien wij een dik neerslag in de urine ontstaan.

Het is de vraag, of in het neerslag alleen hippuurzuur voorkomt of dat, behalve hippuurzuur ook andere benzoëzuur-bevattende verbindingen worden neergeslagen. De nu volgende proef geeft hierop een antwoord.

PROEF. 6. 9. 1922.

Een patiënt gebruikt 10 gr. benzoas natricus. Wij vangen de urine van de 2e drie uur op, voegen aan een gedeelte dezer urine (310 cc.) 6,2 cc. geconcentreerd salpeterzuur

toe en laten deze op een koele plaats gedurende 2 × 24 uur staan. Er ontstaat een neerslag in de urine. Wij filtreeren deze urine en deponeeren het neerslag in den exsiccator, waar het zoolang blijft, tot het gewicht constant is geworden. Wij onderzoeken daarna een bepaalde hoeveelheid van dit neerslag volgens de methoden van Kingsbury-Swanson en Snapper-Laqueur.

200 m.gr. van het neerslag worden afgewogen en behandeld volgens de methode van Kingsbury-Swanson; wij vinden alsdan, dat er 132 m.gr. benzoëzuur aanwezig is, hetgeen overeenkomt met 199,5 m.gr. hippuurzuur. (Dubbel-analyses)

200 m.gr. van het neerslag behandelen wij volgens de methode van Snapper-Laqueur en vinden alsdan, dat er 197,5 m.gr. hippuurzuur aanwezig is. (Dubbel-analyses)

Hieruit blijkt, dat met het salpeterzuur alleen het hippuurzuur neergeslagen wordt, maar niet de onbekende benzoëzuur-verbinding. Tevens heeft men op deze wijze een methode tot zijn beschikking om het hippuurzuur van de onbekende benzoëzuur-verbinding te scheiden.

Men zou kunnen denken, dat gedurende de 2 × 24 uur, dat de urine met 2 % salpeterzuur in de koude geplaatst wordt, splitsing van het hippuurzuur tot vrij benzoëzuur optrad en hierdoor het resultaat van de proeven beïnvloed werd. Derhalve hebben wij het urine-filtraat onderzocht op vrij benzoëzuur.

PROEF. (Zie ook proefdag 1e 9 uur 22. 1. 1923. Proef IV.)

Aan 375 cc. urine van de 1e 9 uur van den proefdag worden 7,5 cc. geconcentreerd salpeterzuur (2 % van het

volume) toegevoegd, waarna men het mengsel goed schudt en gedurende 2 × 24 uur op een koude plaats bewaart; daarna wordt gefiltreerd.

25 cc. van het urine-filtraat worden met 6 × 50 cc. petroleumaether uitgeschud en de petroleumaether verdampt, zooals wij dit uitvoerig besproken hebben bij de methode van Wiechowski.

Na het verdampen ziet men geen kristallen ontstaan, terwijl bij titratie blijkt, dat slechts een paar druppels loog van 0,2 N. noodig zijn.

Hieruit volgt dus: *wanneer wij aan de urine 2 % geconcentreerd salpeterzuur toevoegen en dit mengsel gedurende 2 × 24 uur in de koude plaatsen, geen splitsing van gebonden benzoëzuur tot vrij benzoëzuur optreedt. Wanneer men dus aan de urine, die geloosd wordt na toediening van groote hoeveelheden benzoas natricus, 2% HNO_3 toevoegt, krijgt men na filtratie een vloeistof, die veel minder hippuurzuur, doch evenveel benzoëzuur, dat aan andere stoffen dan aan glycocoll gepaard is, bevat.*

Bij de nu volgende proeven behandelen wij de urine van de diverse proefdagen (1e 8 uur) van de voorafgaande proeven met geconcentreerd salpeterzuur en plaatsen deze urine gedurende 2 × 24 uur op een koele plaats. Er ontstaat een dik neerslag van hippuurzuur, dat wij door filtreeren van de urine scheiden. Met het urinefiltraat verrichten wij dezelfde proeven als met de natieve urine volgens de methode van Kingsbury-Swanson en die van Snapper-Laqueur.

Hieronder volgen de protocollen.

PROEF I.

28. 11. 1922. (Zie ook proef III, proefdag 1e 8 uur, 26. 11. 1922. blz. 55 enz.)

Nadat de qualitatieve en quantitatieve proeven met de natieve urine (880 cc.) afgeloopen zijn, wordt bij de overblijvende urine van den proefdag (530 cc.) 12 cc. geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd. Daarna plaatst men het mengsel gedurende een nacht in de ijskast; er is dan den volgenden ochtend een groot neerslag in de urine ontstaan, dat afgezogen wordt. Het filtraat wordt nu volgens de beide bovengenoemde methoden onderzocht (de uitkomsten moeten wij met $\frac{542}{530}$ vermenigvuldigen, daar bij de urine 12 cc. zwavelzuur toegevoegd is*).

Quantitatief Onderzoek.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urinefiltraat zijn noodig 11,4 cc. Na-aethylaat 0,104 N.
Voor 50 cc. urinefiltraat (contrôle) 11,3 cc. Na-aethylaat 0,104 N.

In 880 cc. urinefiltraat zijn gemiddeld aanwezig 2,605 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 880 cc. urinefiltraat zijn aanwezig A. 2,469 gr. hippuurzuur
B. 2,409 gr. „ ,
gemiddeld 2,439 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 1,662 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte in het urinefiltraat worden dus 943 m.gr. benzoëzuur meer ge-

*) Bij de beoordeeling van de uitkomsten der vier volgende proeven houde men daarmee rekening, dat bij het urine-filtraat 2—3 % salpeterzuur is toegevoegd, zoodat de uitkomsten met 102/100 resp. 103/100 vermenigvuldigd moeten worden.

vonden dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

In de natieve urine van den proefdag was dit surplus 998 m.gr. benzoëzuur. (Zie blz. 56)

Uit deze eenvoudige proef blijkt, dat na het evacueeren van het hippuurzuur in een zoo groot mogelijk quantum, het urinefiltraat nog ongeveer hetzelfde surplus oplevert als de natieve urine; n.l. 943 m.gr. benzoëzuur. Het verschil van 55 m.gr. met het surplus van den proefdag wordt verklaard, doordat wij het groote neerslag weliswaar afzuigen, maar het neerslag op het filter niet kunnen nawasschen, waardoor een klein bedrag van de onbekende benzoëzuur-verbinding achterblijft.

PROEF II.

24. 1. 1923. (Zie ook het protocol van proef IV, proefdag 1e 9 uur, blz. 59)

Nadat de qualitatieve en quantitatieve proeven met de natieve urine (1150 cc.) afgeloopen zijn, wordt aan de overblijvende urine (375 cc.) 2% van het volume geconcentreerd salpeterzuur (7,5 cc.) toegevoegd, waarna men het mengsel flink schudt en gedurende 2 dagen op een koude plaats bewaart. Het hippuurzuur slaat neer en dit neerslag wordt door filtreeren van het urinemengsel gescheiden, waarna men het urinefiltraat op ongebonden benzoëzuur, hippuurzuur en de totale hoeveelheid benzoëzuur onderzoekt.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 25 cc. urinefiltraat zijn noodig 0,08 cc. NaOH 0.2025 N.
Voor 25 cc. urinefiltraat (contrôle) 0,08 cc. NaOH 0.2025 N.

In 25 cc. urinefiltraat zijn dus aanwezig 2,0 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 50 cc. urinefiltraat zijn noodig 12,25 cc. Na-aethylaat 0,09415 N.
Voor 50 cc. urinefiltraat (contrôle) 12,30 cc. Na-aethylaat 0,09415 N.

In 1150 cc. urinefiltraat zijn dus gemiddeld aanwezig 3,312 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 1150 cc. urinfiltraat zijn aanwezig A. 3,106 gr. hippuurzuur
B. 3,154 gr. „ ,
gemiddeld 3,130 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 2,133 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte van het urinefiltraat vinden wij 1,179 gr. benzoëzuur meer dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur. Dit surplus aan benzoëzuur bedroeg in de natieve urine van de 1e 9 uur 1,250 gr. benzoëzuur (zie blz. 60) Het verschil van 71 m.gr. moet worden toegeschreven aan het filtreeren.

PROEF III.

31. 1. 1923. (Zie ook het protocol van proef V, proefdag 1e 8 uur, blz. 64)

Nadat de qualitatieve en quantitatieve proeven met de natieve urine (1230 cc.) afgeloopen zijn, wordt bij de overblijvende urine van den proefdag (305 cc.) 7,2 cc. HNO_3 toegevoegd; het nieuwe volume is 312,2 cc. Het mengsel wordt 2×24 uur in een ijskast geplaatst, waarna wij filtreeren.

Bepaling van het ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 25 cc. urinefiltraat zijn noodig 0,08 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 25 cc. urinefiltraat (contrôle) 0,08 cc. NaOH 0,2025 N.

In 25 cc. urinefiltraat zijn aanwezig 1,98 m.gr. benzoëzuur.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc urinefiltr. zijn noodig 5,20 cc. Na-aethylaat 0,09108 N.
Voor 25 cc. urinefiltr. (contrôle) 5,10 cc. Na-aethylaat 0,09108 N.

In 1230 cc. zijn gemiddeld aanwezig 2,903 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 1230 cc. zijn gemiddeld aanwezig A. 3,178 gr. hippuurzuur
B. 3,218 gr. „ „
gemiddeld 3,198 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 2,180 gr. benzoëzuur.

Bij de bepalingen van de totale hoeveelheid benzoëzuur in het urinefiltraat worden 723 m.gr. benzoëzuur meer gevonden dan overeenkomt met de hoeveelheid benzoëzuur van het aanwezige hippuurzuur.

In de natieve urine van de 1e 8 uur vonden wij voor dit surplus 799 m.gr. (zie blz. 64) Wij hebben dus ook hier weer een verschil en wel 76 m.gr., hetgeen op rekening van het filtreeren geschreven moet worden.

PROEF IV.

9. 2. 1923. (Zie ook het protocol van proef VI, proefdag 1e 8 uur, blz. 67 enz.)

Nadat de qualitatieve en quantitatieve proeven met de natieve urine (700 cc.) afgeloopen zijn, wordt bij de overblijvende urine van den proefdag 9 cc. geconcentreerd salpeterzuur (3 %) toegevoegd en dit mengsel gedurende 2 dagen in een ijskast geplaatst, waarna men filtreert.

Onderzoek op ongebonden benzoëzuur (Wiechowski).

Voor 50 cc. urinefiltraat zijn noodig 0,15 cc. NaOH 0,2025 N.
Voor 50 cc. urinefiltraat (contrôle) 0,10 cc. NaOH 0,2025 N.

In 25 cc. urinefiltraat zijn dus 3 m.gr. benzoëzuur aanwezig.

Bepaling van de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson).

Voor 25 cc. urinefiltr. zijn noodig 7,05 cc. Na-aethylaat 0,093 N.
Voor 25 cc. urinefiltr. (contrôle) 7,05 cc. Na-aethylaat 0,093 N.

In 700 cc. zijn dus aanwezig 2,307 gr. benzoëzuur.

Bepaling van het hippuurzuur (Snapper-Laqueur).

In 700 cc. zijn aanwezig..... A. 2,580 gr. hippuurzuur
B. 2,624 gr. „ ,
gemiddeld 2,602 gr. hippuurzuur, hetgeen overeenkomt met 1,774 gr. benzoëzuur.

Bij de bepaling van het totale benzoëzuur-gehalte in het urinefiltraat vinden wij 533 m.gr. benzoëzuur meer dan overeenkomt met het benzoëzuur-gehalte van het aanwezige hippuurzuur.

In de 1e 8 uur van de natieve urine vonden wij voor dit surplus 490 m.gr. benzoëzuur, zoodat wij ditmaal 43 m.gr. in het urinefiltraat meer vinden.

CONCLUSIES.

Wanneer wij de resultaten, welke de methode van Kingsbury-Swanson oplevert, vergelijken met de resultaten, welke wij verkrijgen met de methode van Snapper-Laqueur, dan komen wij tot de volgende conclusies.

1c. Wij vinden in het urinefiltraat dezelfde hoeveelheid benzoëzuur, dat niet aan glycocoll gepaard is, als in de natieve urine.

2e. De qualitatieve veranderingen blijven in het urinefiltraat bestaan.

3e. Uit 1e en 2e volgt, dat het surplus aan benzoëzuur minst genomen voor een deel aan glucuronzuur gebonden moet zijn.

HOOFDSTUK VIII.

Identificeering van de totale hoeveelheid benzoëzuur.

De totale hoeveelheid benzoëzuur hebben wij bepaald volgens de methode van Kingsbury-Swanson, d.w.z. wij hebben 50 cc. van den proefdag met 7,5 gr. NaOH en 500 m.gr. MgO gedurende ½ uur gekookt, daarna 1 cc. $KMnO_4$ toegevoegd, nog even gekookt en vervolgens afgekoeld. Alsdan wordt de urine met 30 cc. geconcentreerd salpeterzuur opnieuw gekookt (aan een opstijgenden koeler), waarna deze urine met chloroform wordt uitgeschud.

Kingsbury en Swanson veronderstellen, dat het benzoëzuur, dat door splitsing uit hippuurzuur en de andere benzoëzuur-verbindingen ontstaat, in de chloroform oplost en door titreeren met Na-aethylaat alsdan bepaald kan worden. Zeer terecht kan men echter opmerken of het zuur, dat in de chloroform opgelost is, alléén uit benzoëzuur bestaat. Zou er geen andere stof in de chloroform kunnen oplossen, welke eveneens met Na-aethylaat getitreerd kan worden, m.a.w.: zijn de titrimetrische waarden, die wij voor het benzoëzuur verkrijgen, te vertrouwen?

Zouden geen andere zuur reageerende stoffen behalve benzoëzuur onder deze omstandigheden in de chloroform oplossen?

Om deze vragen te beantwoorden hebben wij het volgende gedaan.

PROEF I.

2 × 25 cc. urine van de 1e 8 uur van den proefdag worden volgens de methode van Kingsbury-Swanson behandeld en uitgeschud met chloroform.

De gezamenlijke porties chloroform van de 1e 25 cc. urine worden getitreerd. Wij vinden, dat in 25 cc. urine 135 m.gr. benzoëzuur aanwezig zijn.

De gezamenlijke porties chloroform van de 2e 25 cc. urine worden niet getitreerd, maar aan de lucht verdampt tot een droge massa overblijft. Het residu wordt quantitatief in een weegglas overgebracht, waarna men sublimeert en het gesublimeerde weegt. Men vindt alsdan 128 m.gr. benzoëzuur; er zijn dus 7 m.gr. verloren gegaan, welke op rekening van een fout bij de sublimatie komen.

Wij hebben het hippuurzuur bepaald volgens de methode van Snapper-Laqueur en vinden, dat in 25 cc. urine 140 m.gr. hippuurzuur aanwezig zijn, hetgeen overeenkomt met 95,5 m.gr. benzoëzuur.

Wij vinden dus na de sublimatie nog een duidelijk surplus aan benzoëzuur terug, t.w. 128 m.gr. — 95,5 m.gr = 32,5 m.gr. benzoëzuur.

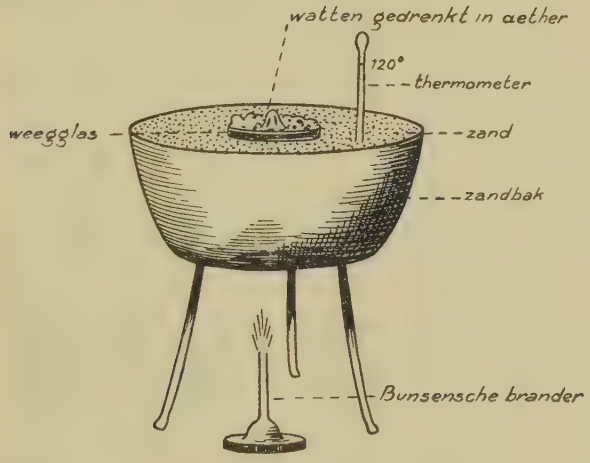
Wij bepalen het smeltpunt van deze 128 m.gr. benzoëzuur. en vinden hiervoor 119—120° en na een 2e sublimatie vinden wij voor het smeltpunt 121—121,5 . (het smeltpunt van benzoëzuur is volgens Kempf 121,4°)

De sublimatie geschiedt als volgt:

Het residu, dat wij na verdamping van de chloroform overhouden, wordt in een weegglas overgebracht, alsdan in een zandbad geplaatst (zie figuur) en bij een temperatuur van 120 gesublimeerd. Op het deksel van het weegglas deponeeren wij watten, gedrenkt in aether, om het

temperatuurverschil grooter te maken. Als de sublimatie beëindigd is, wordt het van te voren getareerde deksel van het weegglas opnieuw gewogen. Het gewichtsverschil moet op rekening van de gesublimeerde stof geschreven worden. Van de aldus verkregen stof wordt het smeltpunt bepaald.

Na de sublimatie blijft in het weegglas een klein bruinachtig residu, dat bij titratie, practisch gesproken, geen zuur blijkt te bevatten.



Bij de volgende proef hebben wij het urinefiltraat (na toevoegen van 2% HNO_3) in plaats van de natieve urine voor onze proeven gebruikt, daar in het urinefiltraat de verschillen tusschen de totale hoeveelheid benzoëzuur en het benzoëzuur van het hippuurzuur procentueel grooter zijn dan in de natieve urine.

PROEF II.

Wij nemen 2 × 25 cc. urinefiltraat en behandelen deze volgens Kingsbury-Swanson als hierboven.

TABEL II.

Uitscheiding van hippuurzuur en andere benz.z. verbindingen *in de natieve urine.*
Totale hoeveelheid benzoëzuur bepaald met de methode van Kingsbury-Swanson.
Hippuurzuur bepaald met de methode van Snapper-Laqueur.
Vrij benzoëzuur bepaald met de methode van Wiechowski.

DATUM	Toegediend	Proef		Totale hoeveelheid Benzoëzuur	Benzoëzuur als Hippuurzuur	Benzoëzuur niet aan Glycocoll.	Benzoëzuur niet aan Glycocoll. in perc.	Vrij Benzoëzuur	Glucuronzuur-Reacties	OPMERKINGEN
16-11-1922.	15 gr.	I	Proefdag 1e 8 uur	11,312 gr.	10,491 gr.	821 gr.	= 7,3 %	*niet bepaald*	+ + +	
24-11-1922.	15 gr.*)	II	Proefdag 1e 8 uur	5,762 gr.	5,316 gr.	446 gr.	= 7,7 %	*niet bepaald*	+ + +	*) Een half uur na de toediening heeft patient gebraakt.
25-11-1922.	15 gr.	III	Voord. 12 u.	0,515 gr.	0,515 gr.	—		*niet bepaald*	— — —	
			Proefdag							
			1e 8 uur	11,646 gr.	10,648 gr.	0,998 gr.	= 8,57%	*niet bepaald*	+ + +	
			2e 8 uur	0,369 gr.	0,286 gr.	0,083 gr.		*niet bepaald*	zwak +	
			3e 8 uur	0,483 gr.	0,422 gr.	—		*niet bepaald*	— — —	
21-1-1923.	15 gr.	IV	Voord. 24 u.	1,826 gr.	1,754 gr.	—		2,47 mgr.	— — —	
			Proefdag							
			1e 8 uur	11,037 gr.	9,787 gr.	1,250 gr.	= 11,3%	2,47 mgr.	+ + +	
			2e 8 uur	1,611 gr.	1,606 gr.	—		2,47 mgr	— — —	
			3e 8 uur	0,325 gr.	0,326 gr.	—		—	— — —	
29-1-1923.	15 gr.	V	Voord. 24 u.	1,136 gr.	1,171 gr.	—		2,47 mgr.	— — —	
			Proefdag							
			1e 8 uur	10,750 gr.	9,951 gr.	0,799 gr.	= 7,43%	2,47 mgr	+ + +	
			2e 8 uur	0,477 gr.	0,472 gr.	—		2,47 mgr.	— — —	
			3e 8 uur	0,387 gr.	0,360 gr.	—		—	— — —	
6-2-1923.	15 gr.	VI	Voord. 24 u.	1,541 gr.	1,618 gr.	—		2,47 mgr.	— — —	*) Verlangzaamde uitscheiding van hippuurzuur en andere benzoëzuur-verbindingen bij menschen met normale nieren.
			Proefdag							
			1e 8 uur*)	6,166 gr.	5,677 gr.	0,489 gr.	= 7,93%	2 mgr.	+ + +	
			2e 8 uur*)	5,764 gr.	5,317 gr.	0,447 gr.	= 7,75%	1,23 mgr.	+ + +	
			3e 8 uur	0,526 gr.	0,537 gr.	—		2 mgr.	— — —	

TABEL III.

Uitscheiding van hippuurzuur en andere benzoëzuur-verbindingen in de urine van den proefdag (1e 8 uur), waaraan 2 % HNO_3 toegevoegd is. Het neerslag, dat na 2 × 24 uur staan in de koude ontstond, werd afgefiltreerd en in het urinefiltraat werd bepaald:

1°. De totale hoeveelheid benzoëzuur met de methode van Kingsbury-Swanson.
2°. Het hippuurzuur met de methode van Snapper-Laqueur.
3°. Het vrije benzoëzuur met de methode van Wiechowski.

DATUM	Toegediend	Proef	Proefdag	Totale hoeveelh. Benzoëzuur	Benzoëzuur als Hippuurz.	Benzoëzuur niet aan Glycocoll.	In % uitgedrukt	Benzoëz. niet aan Glycocoll in de natieve urine zonder toevoeging van HNO_3	In % uitgedrukt	Vrij benzoëzuur	Glucuronzuur-Reacties		
25-11-1922.	15 gram	I	1e 8 u. urinefiltraat	2,605 gr.	1,662 gr.	0,943 gr.	= 36,2%	0,998 gr.	= 8,5%	*niet bepaald*	+	+	+
22-1-1923.	15 gram	II	1e 8 u. urinefiltraat	3,312 gr.	2,133 gr.	1,179 gr.	= 35,6%	1,250 gr.	= 11,3%	2,0 m. gr.	+	+	+
29-1-1923.	15 gram	III	1e 8 u. urinefiltraat	2,903 gr.	2,180 gr.	0,723 gr.	= 24,9%	0,799 gr.	= 7,4%	1,93 m. gr.	+	+	+
6-2-1923.	15 gram	IV*)	1e 8 u. urinefiltraat	2,307 gr.	1,774 gr.	0,533 gr.	= 23,2%	0,489 gr.	= 7,9%	3,0 m. gr.	+	+	+

*) Verlangzaamde uitscheiding van Hippuurzuur en andere Benzoëzuur-verbindingen bij menschen met normale nieren.

Bij titratie vinden wij, dat in de 1e 25 cc. urinefiltraat 54,5 m.gr. benzoëzuur aanwezig zijn.

Na sublimatie en weging vinden wij, dat in de 2e 25 cc. 54,5 m.gr. benzoëzuur aanwezig zijn.

Volgens de methode van Snapper-Laqueur zijn in 25 cc. urinefiltraat 58,7 m.gr. hippuurzuur aanwezig, hetgeen overeenkomt met 40 m.gr. benzoëzuur (dubbel-analyses).

Wij vinden ook hier weer, dat het surplus aan benzoëzuur na de sublimatie bestaan blijft. Het smeltpunt van de gesublimeerde stof ligt bij 119° en na een 2e sublimatie vinden wij voor het smeltpunt 121—121,5°, hetgeen overeenkomt met het officieele smeltpunt van benzoëzuur.

Deze proef herhaalden wij nog 3 malen met de urinefiltraten van andere proefdagen (1e 8 uur), met dezelfde resultaten.

Aldus is bewezen, dat de titrimetrische waarden, welke volgens de methode van Kingsbury-Swanson verkregen worden, werkelijk de totale hoeveelheid benzoëzuur weergeven, welke in de urine voorkomt.

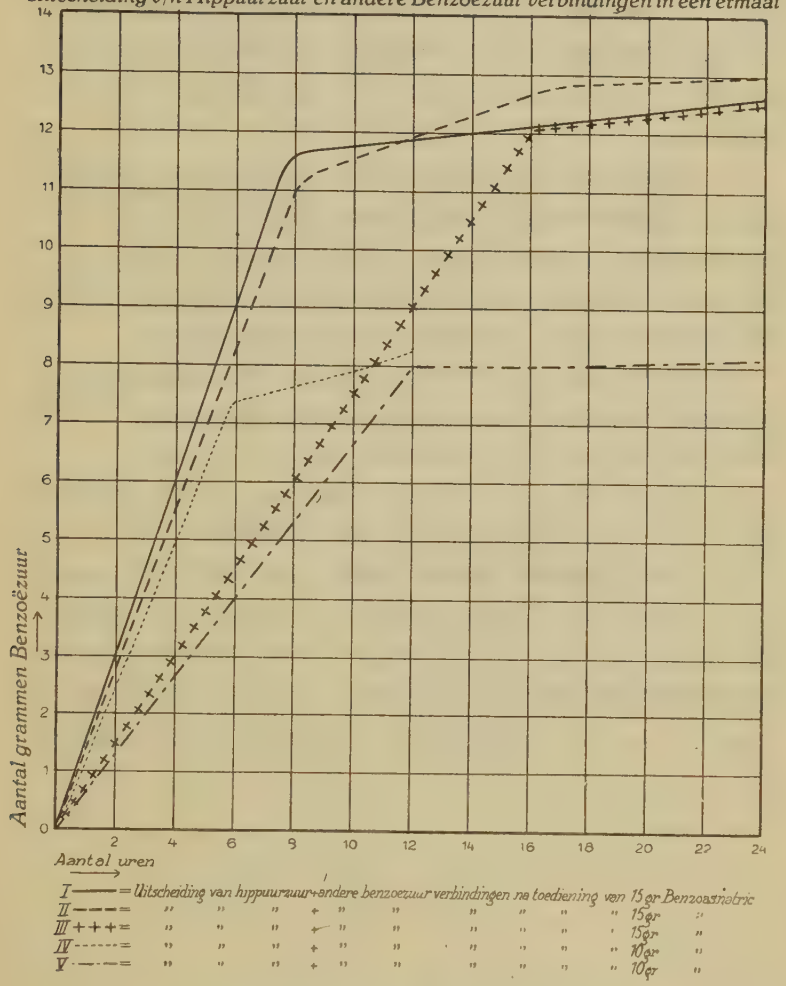
Zoowel bij de titratie als bij de sublimatie blijkt, dat de hoeveelheid benzoëzuur, die aan het glycocoll gepaard in de urine van den proefdag aanwezig is, kleiner is dan de totale hoeveelheid benzoëzuur, die hierin bepaald kan worden. Er moet dus benzoëzuur gebonden aan andere verbindingen in de urine voorkomen. Gelijk boven reeds gezegd, is het wegens de sterke glucuronzuur-reacties in de urine waarschijnlijk, dat minst genomen een gedeelte van dit benzoëzuur aan glucuronzuur gebonden is.

Hiermee zijn de quantitatieve proeven als beëindigd te beschouwen.

Wij hebben de resultaten, die wij met de methoden van Kingsbury-Swanson en Snapper-Laqueur verkregen heb-

Tabel IV.

Uitscheiding v/h Hippuurzuur en andere Benzoëzuur verbindingen in een etmaal


Aantal grammen Benzoëzuur
Aantal uren
I —— = Uitscheiding van hippuurzuur+andere benzoezuur verbindingen na toediening van 15 gr Benzoas natric
II — — — = " " " + " " " " " " 15gr "
III +++ = " " " + " " " " " " 15gr "
IV ------ = " " " + " " " " " " 10gr "
V ·—·—· = " " " + " " " " " " 10gr "

ben, in tabel II samengevat. Men ziet hieruit, dat na toediening van 10—15 gr. benzoas natricus, welke de patiënt binnen een ½ uur inneemt, het grootste gedeelte gedu-

rende de 1e 8 uur uitgescheiden wordt (80—90 %); met uitzondering van proef II, waar de patiënt gebraakt heeft en proef VI, waar een langzame uitscheiding plaats gehad heeft. Verder blijkt, dat de totale hoeveelheid benzoëzuur, die de 1e 8 uur van den proefdag uitgescheiden wordt, grooter is dan de hoeveelheid, die aan het glycocoll gebonden is.

Dit surplus aan benzoëzuur blijft ook bestaan, wanneer men het hippuurzuur voor een groot deel uit de urine verwijdert door toevoeging van sterke minerale zuren, t.w.: wij vinden hetzelfde surplus aan benzoëzuur in het urinefiltraat terug als in de natieve urine (tabel III).

Uit de grafische voorstelling van blz. 107 (tabel IV) kan men zien, hoe de uitscheiding van het hippuurzuur en de onbekende benzoëzuur-verbinding verloopt.

Wat nu ten slotte de uitscheiding van de benzoëzuurglucuronzuurverbinding betreft het volgende:

Het is ons gebleken, dat de uitscheiding van het benzoëglucuronzuur en eventueel andere aan benzoëzuur gebonden stoffen parallel verloopt aan de uitscheiding van het hippuurzuur. Dit parallelisme blijft bestaan, indien de uitscheiding van het hippuurzuur vertraagd is. (Zie tabel III).

EIND-CONCLUSIES.

Resumeerende komen wij tot de volgende resultaten:

1e. Na toediening van 10—15 gr. benzoas natricus per os, komt in de menschelijke urine geen vrij benzoëzuur voor, evenmin als in de normale urine van menschen met gemengd diëet.

2e. Na toediening van 10—15 gr. benzoas natricus, ontstaat er naast het hippuurzuur een andere verbinding in de urine, waardoor de reacties van Fehling, Nylander, Naphtoresorcine, Orcine en Phloroglucine positief uitvallen, terwijl de urine na koken met zuur rechts draait.

Deze stof moet dus als glucuronzuur-verbinding beschouwd worden.

3e. Na toediening van 10—15 gr. benzoas natricus vindt men in de urine naast het hippuurzuur nog een benzoëzuur-houdende verbinding. Het ligt dus voor de hand aan te nemen, dat een gedeelte van het benzoëzuur niet als hippuurzuur, maar gebonden aan glucuronzuur wordt uitgescheiden.

4e. Wij vinden ongeveer 90 % van het benzoëzuur als hippuurzuur en ongeveer 7,5—11 % van het benzoëzuur als een andere verbinding, vermoedelijk als benzoë-glucuronzuur terug.

5e. De methoden, welke de hoeveelheid hippuurzuur berekenen uit de totale hoeveelheid benzoëzuur (Kingsbury-Swanson) geven dus te hooge waarden voor het hippuurzuur.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR.

1. E. Salkowski. Ztschr. f. physiol. Chemie. I. 25. 1877.
2. E. Salkowski. id. id. id. IV. 135. 1880.
3. K. Siebert. Ueber die nach Benzaldehyd und Benzoesäure Darreichung im Harn auftretende reduzierende Stoffe. Inaug. Diss. b. Jaffe. Königsb. 1901.
4. Kobert. Schmidt's Jahrb. CLXXXV. 113. 1880.
5. Th. Brugsch u. R. Hirsch. Hipp.säure Synthese u. Ausscheidung der Benzoesäure beim Hunde. - Ztschr. f. Exp. Pathol. u. Ther. III. 663. 1906.
6. Magnus Levy. Ueber das Auftreten einer Benzoesäure-Glucuronsäureverbindung im Hammelharn nach Benzoesäure-fütterung. - Biochem. Ztschr. VI. 1907. bldz. 502.
7. Jaffe. Verhalten des p.-Dimethylaminobenzaldehyds im tierischen Stoffwechsel. Ztschr. f. Physiol. Chem. XXXXIII. 374—376. 1904.
8. Thierfelder. Ztschr. f. Physiol. Chem. XIII. 275. 1888.
9. Wiechowski. Beiträge zur Chem. Physiol. u. Pathol. VIII. 204. 1906.
10. Thierfelder u. von Mering. Das Verhalten tertiairer Alkohole im Organismus. — Ztschr. f. physiol. Chemie. IX. 50. 1883.
11. Lewinski. Ueber die Grenze der Hipp.-säure Bildung beim Menschen. Arch. f. experim. Path. u. Pharmak. LVIII. 397. 1908.
12. Brugsch. Ztschr. f. exp. Path. u. Ther. V. 731. 1909.
13. H. D. Dakin. The fate of sodium benzoate in the human organism. Journal of biol. chem. VII. 103-108. 1909.
14. J. Tsuchiya. Ueber den Umfang der Hipp.-säure Synthese beim Menschen. Ztschr. f. exp. Path. u. Ther. V. 737. 1909.

15. F. Blumenthal. Maly's Jahresberichte. XXX. 363. 1910. Ztschr. f. klin. Mediz. XXXX. 339—344.
16. Henriques u. Sörensen. Ztschr. f. physiol. Chem. LXIII. 327.
17. R. Cohn. Festschrift für Jaffe. Braunschweig. III. 327. 1901.
18. Jaarsveld en Stokvis. Archif f. exp. Path. u. Pharm. X. 71. 1879.
19. H. Steenbock. The Journal of biolog. Chem. XI. 205. 1912.
20. Folin and Flanders. The Journal of biolog. Chem. XI. 1912.
21. Kingsbury and Swanson. The Journal of biolog. Chem. XXXXVIII. 1921.
22. Violle. Annales de Médecine. 1920.
23. Lewis. Journal of biolog. Chem. XVIII. 1914.
24. Kronecker. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. XVI.
25. Seo. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. LVIII. 440. 1908.
26. Schmiedeberg. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. XIV. 379. 1881.
27. Minkowski. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. XVII. 44. 1883.
28. Wiener. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. XXXX. 313. 1897—1898.
29. Epstein u. Buckmann. Journal of biolog. Chem. XX. 353.
30. Abderhalden u. Strauss. Ztschr. f. physiol. Chem. LXXXXI 81. 1914.
31. Kingsbury and Bell. Journal of biol. Chem. XX. 373. 1915.
32. Van de Velde en Stokvis. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. XVII. 189. 1883.
33. Weyl u. Anrep. Ztschr. f. physiol. Chemie. IV. 169. 1880.
34. Henneberg. Mitt. d. Landwirtsch. Instit. d. Kgl. Univ. Breslau. II. 273. 1904.
35. Wreden. Chem. Centralblatt. 552. 1859.
36. Loebisch. Loebisch Anleitung zur Harnanalyse. 2te Aufl. S. 133.
37. Cazeneuve. Loebisch Anleitung zur Harnanalyse. 2te Aufl. S. 133.
38. Blumenthal. Ztschr. f. klin. Mediz. XXXX. 339—344.

39. Pfeiffer, Bloch und Riecke. Eine neue Methode zur Bestimmung der Hippursäure. Mitt. d. Landwirtsch. Instit. Kgl. Univ. Breslau. II. 292. 1904.
40. Rem-Picci. Ztschr. f. Tierchemie. 316. 1903.
41. P. Mayer u. C. Neuberg. Ztschr. f. physiol. Chem. XXVIIII. 256. 1900.
42. C. Neuberg u. C. Saneyoshi. Biochem. Ztschr. XXXVI. 56. 1911. Ueber den Nachweis kleiner Mengen Glucuronsäure als Osazon.
43. Bunge u. Schmiedeberg. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. X. 1876.
44. Lewis. Journal of biol. Chem. XVIII. 1914.
45. Blumenthal u. Braunstein. Hofmeister's Beiträge. III. 1903.
46. Th. Hryntschak. Biochem. Ztschr. XXXXIII. 315.
47. Snapper et Laqueur. Extrait des Archives néerlandaises Tome VI. 1921.
48. Raiziss and Dubin. Journal of biol. Chem. XXI. 331. 1915.
49. Soetbeer. Zeitschr. f. Klin. Mediz. XXXX.
50. E. Remy. Ueber die quantitativen Bestimmung der Benzoesäure. Apotheker Zeitung. XXVI. 835. 1911.
51. A. W. van der Haar. Ueber den Nachweis der d.-Glucuronsäure und ähnlich sich verhaltenden Säure mittels der Naphtoresorcin Reaktion. — Biochem. Zeitschr. LXXXVIII. 205. 1918.
52. E. Baumann. Die aromatischen Verbindungen im Harn und die Darmfäulnis. Ztschr. f. physiol. Chemie. X. 123. 1885.
53. J. Snapper. Over het verband van stikstofretentie in het serum en stoornis der Hippuurzuur-uitscheiding. Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 2e Helft. No. 19. 1921.
54. J. Snapper, A. Grünbaum en J. Neuberg. De beteekenis van de nier voor den opbouw van het Hippuurzuur bij Mensch, Hond, Varken en Schaap. — Ned. Tijdschr. v. Geneeskunde. 1e Helft. No. 5. 1923.